



M 2018

TRANSFERÊNCIA DE *OFF-FLAVOURS* ATRAVÉS DA ROLHA DE CHAMPANHE

ANA LUÍSA CORREIA DA CRUZ

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA

À FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM
ENGENHARIA QUÍMICA

Mestrado Integrado em Engenharia Química

***Transferência de off-flavours através da rolha
de champanhe***

Dissertação de Mestrado

de

Ana Luísa Correia da Cruz

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

Amorim & Irmãos, S.A. - Departamento de Investigação e Desenvolvimento



Orientador na FEUP: Professora Doutora Margarida Bastos

Orientador na Amorim & Irmãos: Professor Doutor Miguel Cabral



Departamento de Engenharia Química

Julho de 2018

Agradecimentos

A realização da presente dissertação só foi possível graças à oportunidade de estágio cedida pela empresa Amorim & Irmãos, S.A., à qual quero deixar o meu sincero agradecimento, realçando o excelente trabalho de integração e contínuo acompanhamento prestado no programa de estágios.

Aos meus orientadores. Ao Professor Doutor Miguel Cabral, pela orientação do trabalho realizado, pela partilha de conhecimentos e pelas críticas construtivas. À Professora Doutora Margarida Bastos, pelo interesse, disponibilidade e dedicação demonstrados.

Ao José Pedro Machado, pela constante transmissão de conhecimentos, pela dedicação e acompanhamento, pelos conselhos e pela confiança depositada em mim.

A toda a equipa do I&D, os meus sinceros agradecimentos. Ao Doutor Paulo Lopes, pelo interesse demonstrado. À Ana Malheiro, pela integração no I&D e pelos conhecimentos transmitidos. Às colaboradoras Salomé Reis, Glória Espinheira, Andreia Rodrigues, Patrícia Oliveira, Rosa Castro e Joaquina Laranjeira, pelo excelente ambiente de trabalho e pela ajuda disponibilizada para a realização deste projeto.

À equipa da CHK. À diretora da qualidade, Elvira Miravall, pela oportunidade de realizar ensaios no laboratório. À Joaquina Veiga e a todas as colaboradoras do laboratório, em especial à Clementina Sousa e à Maria da Luz, por toda a disponibilidade e auxílio prestados na realização dos ensaios.

Aos meus colegas de estágio Sofia, Nádia e Wilson, por estes seis meses de companheirismo, entreajuda e boa disposição.

Ao João, por estar presente em mais uma etapa importante da minha vida. À Sónia, pela amizade verdadeira de tantos anos. A todos os meus amigos e familiares.

Aos meus pais, pelo carinho, pelo apoio e por tornarem possível a conclusão de mais um objetivo. Por mesmo tão longe, se fazerem sentir sempre tão perto.

A Prof. Margarida Bastos, orientadora desta dissertação, é membro integrado do LEPABE - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente Biotecnologia e Energia, financiado por: Projeto POCI-01-0145-FEDER-006939 (Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia, UID/EQU/00511/2013) - financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 - Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia I.P.; Projeto “LEPABE-2-ECO-INNOVATION”, com a referência NORTE-01-0145-FEDER-000005, cofinanciado pelo Programa Operacional Regional do Norte (NORTE 2020), através do Portugal 2020 e do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER).

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.”*
Ricardo Reis

Resumo

Apesar das características únicas das rolhas de cortiça, a indústria corticeira sofreu, no final dos anos noventa, uma quebra no negócio por estas conferirem ao vinho um aroma e sabor a mofo e bafio. O 2,4,6-Tricloroanisol (TCA) foi o primeiro composto a ser identificado como causa do “sabor a rolha”. A presente dissertação faz três abordagens relacionadas com questões sensoriais nas rolhas de champanhe de dois discos, nomeadamente: o estudo da migração de TCA e a avaliação da migração de *off-flavours* exógenos para os vinhos, e a avaliação do efeito dos *off-flavours* na evolução sensorial dos espumantes.

Foi estudada a migração de TCA na rolha de champanhe de dois discos, com diferentes distribuições de TCA nos corpos RCT ($\text{TCA} < 2 \text{ ng/L}$ e $2 \text{ ng/L} < \text{TCA} < 10 \text{ ng/L}$) e nos discos ($\text{TCA} < 0,5 \text{ ng/L}$, $0,5 \text{ ng/L} < \text{TCA} < 5 \text{ ng/L}$ e $\text{TCA} > 5 \text{ ng/L}$). Nas rolhas com disco de interior positivo, verificou-se que existiu migração de TCA para o vinho, com uma incidência de 60 % e 80 %, ao fim de 6 e 12 meses, respetivamente. Nas rolhas com disco de espelho positivo, a ocorrência de contaminação dos vinhos foi superior nos mesmos períodos (6 e 12 meses), com valores de 73 % e 90 %, respetivamente. É, por isso, expectável que a relação da migração de TCA nos discos com o tempo de armazenamento aumente proporcionalmente. No que diz respeito à migração de TCA para os vinhos a partir dos corpos RCT, os resultados obtidos permitem concluir que aos 12 meses não existiu qualquer contaminação dos mesmos.

Paralelamente, para verificar a migração de *off-flavours* exógenos para os vinhos, submeteram-se garrafas obturadas com rolhas de cortiça natural, rolhas de champanhe de dois discos, vedantes sintéticos Nomacorc e cápsulas de rosca a uma atmosfera contaminada com 100 µg de TBA e de d₅-TCA, respetivamente. Aos 24 meses, a rolha de cortiça natural, a rolha de champanhe de dois discos e a cápsula de rosca demonstraram eficácia na vedação ao TBA e ao d₅-TCA, uma vez que os vinhos não apresentaram estes contaminantes. Por outro lado, o vedante sintético Nomacorc revelou-se permeável pois todos os vinhos apresentaram d₅-TCA.

De forma a verificar o efeito dos *off-flavours* na evolução sensorial dos espumantes, vedaram-se garrafas com rolhas de champanhe de dois discos com diferentes descritores sensoriais, nomeadamente: TCA, mofo, químico, putrefação, vegetal e cera/cola. Após 24 meses, apenas o *off-flavour* TCA apresentou diferenças robustas ao nível sensorial perante amostras neutras. Nos casos em que outros *off-flavours* foram percecionados nas análises sensoriais, os vinhos estavam contaminados com TCA, verificando-se que este composto é um marcador bastante importante de desvios sensoriais em vinhos.

Palavras Chave: TCA, *off-flavours*, migração, rolha de champanhe, rolha de dois discos, cortiça

Abstract

The cork stoppers have unique characteristics, however, late in the nineties, cork industry suffered from a break in the business due to the mould and mildew smell and taste that stoppers would confer to the wine. The 2,4,6-Trichloroanisole (TCA) was the first compound to be identified as the cause for the “cork flavour”. The present dissertation deals with three approaches related with sensorial issues in the two disks champagne stoppers, particularly: the study of the TCA migration and the evaluation of the exogenous off-flavours migration to the wine and the evaluation of the off-flavours effect on the evolution of sparkling wines.

The TCA migration in the two disk champagne stoppers was studied with different distributions of TCA in the RCT bodies ($\text{TCA} < 2 \text{ ng/L}$ and $2 \text{ ng/L} < \text{TCA} < 10 \text{ ng/L}$) and in the disks ($\text{TCA} < 0,5 \text{ ng/L}$, $0,5 \text{ ng/L} < \text{TCA} < 5 \text{ ng/L}$ and $\text{TCA} > 5 \text{ ng/L}$). Stoppers with positive inner disks displayed the presence of TCA migration to the wine, with a total occurrence of 60 % and 80 %, respectively after 6 and 12 months. On the other hand, stoppers with positive mirror disks, demonstrated the existence of contaminated wines with superior values in the same periods (6 and 12 months) with respective values of 73 % and 90 %. Therefore, it is expectable that the relationship between TCA migration in the disks and the storage time increase proportionately. Regarding the TCA migration to the wines from the RCT bodies, the obtained results allowed to conclude that at 12 months there was no contamination by TCA.

Simultaneously, to verify the exogenous off-flavours migration to the wines, bottles sealed with natural cork stoppers, two disk champagne stoppers, Nomacorc synthetic seals and screw capsules were submitted to an atmosphere contaminated with 100 μg TBA and other with $\text{d}_5\text{-TCA}$. After 24 months, the natural cork stopper, the two disk champagne stoppers and the screw capsules displayed high efficiency sealing the TBA and the $\text{d}_5\text{-TCA}$, since the wines did not present any of these contaminants. On the other hand, the Nomacorc synthetic seal revealed to be permeable, as all the wines presented $\text{d}_5\text{-TCA}$.

In order to verify the effect of the off-flavours in the sensorial evolution of the sparkling wines, bottles with two disks champagne stoppers were sealed with different sensorial descriptors, namely: TCA, mould, chemicals, putrefaction, vegetal and glue/wax. 24 months after, only the off-flavour TCA presented robust differences at the sensorial level towards neutral sample. In cases where the off-flavours were perceived in the sensorial analysis, wines were contaminated with TCA. It was verified that this specific compound is a very important marker to sensorial deviations in wines.

Key-words: TCA, off-flavours, migration, champagne stopper, two disks stopper, cork

Declaração

Declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

Assinar e datar

(Ana Luísa Correia da Cruz)

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Enquadramento e Apresentação do Projeto	1
1.2	Apresentação da Empresa	1
1.3	A cortiça	2
1.4	A rolha de champanhe	3
1.5	Haloanisóis e outros <i>off-flavours</i>	5
1.6	Organização da Tese	8
1.7	Contributos do Trabalho	9
2	Contexto e Estado da Arte	10
3	Migração de TCA na rolha de champanhe de dois discos	15
3.1	Metodologia	15
3.2	Resultados e Discussão	18
4	Migração de <i>off-flavours</i> exógenos através da cortiça	25
4.1	Metodologia	25
4.2	Resultados e Discussão	27
5	Impacto dos <i>off-flavours</i> no vinho espumante	31
5.1	Metodologia	31
5.2	Resultados e Discussão	32
6	Conclusões	37
7	Avaliação do trabalho realizado.....	38
7.1	Objetivos Realizados	38
7.2	Outros Trabalhos Realizados.....	38
7.3	Limitações e Trabalho Futuro	39
7.4	Apreciação Final	39
Anexo 1	Método de análise SPME-GC-ECD/MS.....	43
Anexo 2	Migração de <i>off-flavours</i> exógenos através da cortiça	48
Anexo 3	Impacto dos <i>off-flavours</i> no vinho.....	50

Anexo 4 Avaliação da eficácia do SuperROSA® na rolha de champanhe de dois discos 55

Anexo 5 Tecnologias/processos alternativos para a redução do teor de pó da rolha de champanhe 59

Índice de figuras

<i>Figura 1 - SPARK®, a rolha de champanhe de dois discos comercializada pela A&I [10].</i>	3
<i>Figura 2 - Mecanismo de formação do TCA. Adaptado de [14],[15].</i>	6
<i>Figura 3 - Roda dos desvios sensoriais da cortiça [17].</i>	8
<i>Figura 4 - Evolução da concentração média de TCA (ng/L) das rolhas naturais do grupo CQC desde 2001 até 2017. Adaptado de [19].</i>	10
<i>Figura 5 - Esquema de distribuição de TCA (ng/L) dos diferentes grupos de rolhas de champanhe em estudo [31].</i>	16
<i>Figura 6 - Resultados de TCA nos corpos RCT, nos discos e nos vinhos correspondentes, aos 6 meses. Os valores de TCA superiores a 5,5 ng/L são considerados iguais a esse valor por se encontrarem fora da gama analítica da curva de calibração (de 0,5 a 5,5 ng/L).</i>	21
<i>Figura 7 - Resultados de TCA nos corpos RCT, nos discos e nos vinhos correspondentes, aos 12 meses. Os valores de TCA superiores a 5,5 ng/L são considerados iguais a esse valor por se encontrarem fora da gama analítica da curva de calibração (de 0,5 a 5,5 ng/L).</i>	24
<i>Figura 8 - Disposição dos frascos com os contaminantes e de algumas das garrafas no interior do barril (à esquerda) e válvula exterior e pressão do barril (à direita).</i>	25
<i>Figura 9 - Processo de preparação dos vedantes para posteriores macerações (em cima, à esquerda - rolha de champanhe de dois discos; em cima, à direita - rolha natural; em baixo, à esquerda - rolha sintética Nomacorc; em baixo, à direita - cápsula de rosca).</i>	26
<i>Figura 10 - Valores médios de concentração de TBA (ng/L) nos vinhos e nos segmentos inferior e superior dos vedantes (RN - rolha natural; RC 2D - rolha de champanhe de dois discos; Nom. - vedante sintético Nomacorc; SC - cápsula de rosca), aos 24 meses.</i>	28
<i>Figura 11 - Valores médios de concentração de d₅-TCA (ng/L) nos vinhos e nos segmentos inferior e superior dos vedantes (RN - rolha natural; RC 2D - rolha de champanhe de dois discos; Nom. - vedante sintético Nomacorc; SC - cápsula de rosca), aos 24 meses.</i>	29
<i>Figura A.1.1 - Exemplo de integração dos picos do analito (2,4,6-TCA) e do padrão interno (2,3,6-TCA) [34].</i>	43
<i>Figura A.1.2 - Reta de calibração para quantificação de TCA na gama de concentração de 0,5 a 5,5 ng/L.</i>	45
<i>Figura A.1.3 - Reta de calibração para quantificação de d₅-TCA na gama de concentração de 0,5 a 20,0 ng/L.</i>	46
<i>Figura A.1.4 - Reta de calibração para quantificação de d₅-TCA na gama de concentração de 0,5 a 200,0 ng/L.</i>	46
<i>Figura A.1.5 - Reta de calibração para quantificação de TBA na gama de concentração de 0,5 a 20,0 ng/L.</i>	47

<i>Figura A.3. 1 - Exemplo de uma folha de prova de análise sensorial triangular.</i>	<i>53</i>
<i>Figura A.4.1 - Percentagem de discos por cada gama de concentração de TCA, no momento inicial, após passagem no SR, após a retificação e após dois meses da retificação (n=46).</i>	<i>56</i>
<i>Figura A.5.1 - Média dos valores mínimos, médios e máximos dos ensaios de quantificação do teor de pó, registados entre os anos 2012 e 2018.</i>	<i>60</i>
<i>Figura A.5.2 - Escovas no processo de retificação das rolhas.</i>	<i>61</i>
<i>Figura A.5.3 - Tambor (esquerda) para aplicação do tratamento de superfície (direita).</i>	<i>62</i>
<i>Figura A.5.4 - Teor de pó dos ensaios com rolhas tratadas com CAF e PWS.</i>	<i>63</i>
<i>Figura A.5.5 - Exemplos de filtros de ensaios de quantificação de pó em rolhas com CAF (à esquerda) e em rolhas com PWS (à direita).</i>	<i>64</i>
<i>Figura A.5.6 - Comparação visual de rolhas com PWS (em cima) e CAF (em baixo).</i>	<i>64</i>
<i>Figura A.5.7 - Frascos após ensaios de migração de rolhas tratadas com PWS (em cima) e rolhas tratadas com CAF (em baixo).</i>	<i>65</i>

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1 - Unidades Industriais da Amorim & Irmãos, S.A., [3].</i>	2
<i>Tabela 2 - Estrutura química e limite de deteção sensorial, em água e em solução alcoólica, dos principais haloanisóis envolvidos na contaminação do vinho pela rolha de cortiça [16].</i>	7
<i>Tabela 3 - Valores de TCA nos lotes de RCT.</i>	15
<i>Tabela 4 - Valores de TCA nos discos das rolhas dos grupos 3a, 3b, 4a e 4b.</i>	17
<i>Tabela 5 - Valores de TCA das rolhas (corpos RCT e discos) e vinhos aos 6 meses.</i>	20
<i>Tabela 6 - Valores de TCA das rolhas (corpos RCT e discos) e vinhos aos 12 meses.</i>	23
<i>Tabela 7 - Concentração de TBA e d₅-TCA dos vinhos e dos vedantes (segmento superior e inferior) aos 24 meses.</i>	30
<i>Tabela 8 - Análises sensoriais triangulares aos 6 meses.</i>	33
<i>Tabela 9 - Análises de TCA pelo método SPME-GC-MS aos vinhos a 6 meses.</i>	33
<i>Tabela 10 - Análises sensoriais triangulares aos 12 meses.</i>	34
<i>Tabela 11 - Análises de TCA pelo método SPME-GC-MS aos vinhos a 12 meses.</i>	34
<i>Tabela 12 - Análises sensoriais triangulares aos 24 meses.</i>	35
<i>Tabela 13 - Análises de TCA pelo método SPME-GC-MS aos vinhos a 24 meses.</i>	35
<i>Tabela A.1.1 - Preparação da reta de calibração para a gama de análise de 0,5 a 5,5, ng/L.</i>	45
<i>Tabela A.2. 1 - Distribuição das garrafas com os diferentes vedantes pelos barris.</i>	48
<i>Tabela A.2. 2 - Massas de d₅-TCA e de TBA por barril.</i>	49
<i>Tabela A.3.1 - Amostragens de sniffing de diferentes lotes de rolhas 2D.</i>	50
<i>Tabela A.3.2 - Análise química ao vinho realizada no laboratório da CVRVV, 6 dias após engarrafamento.</i>	51
<i>Tabela A.3.3 - Exemplo de distribuição das garrafas pelas diferentes séries de copos numa análise sensorial triangular.</i>	52
<i>Tabela A.3.4 - Número mínimo de respostas corretas para estabelecer diferença significativa entre as amostras, em vários níveis de significância (se o número de respostas corretas for maior ou igual ao número tabelado, existe diferença significativa entre as amostras, ao nível de significância observado) [33].</i>	54
<i>Tabela A.4.1 - Valores de TCA dos discos no momento inicial, após o SR, após retificação e após 2 meses.</i>	58
<i>Tabela A.5.1 - Valores de absorvância a 280 e 420 nm após ensaios de migração com CAF e PWS.</i>	65

Notação e Glossário

C_i	Concentração inicial	$\mu\text{g/mL}$
C_f	Concentração final	$\mu\text{g/mL}$
V_i	Volume de solução inicial	mL
V_f	Volume de solução final	mL

Lista de Siglas

AD	Amorim Distribuição
A&I	Amorim & Irmãos, S.A.
APCOR	Associação Portuguesa da Cortiça
ATS	Amorim Top Series
CHK	Champcork
CPOMT	Clorofenol <i>O</i> -metiltransferase
CQC	<i>Cork Quality Council</i>
CVRVV	Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes
DO	Densidade Óptica
DS	De Sousa
D ₅ -TCA	2,4,6-Tricloroanisol-deuterado
ECD	Detetor de captura de eletrões
ETS	<i>Enological Technological Services</i>
FBT	<i>Fluidized Bed Technology</i>
GC	Cromatografia gasosa
I&D	Departamento de Investigação e Desenvolvimento
MO	Microondas
MS	Espetroscopia de massa
ND	Não detetável
PCA	Pentacloroanisol
PK	Portocork
RCT	Rolhas de Champanhe e Twin Top®
ROSA	<i>Rate Of Optimal Steam Application</i>
SPME	Microextração em Fase Sólida
SR	SuperROSA®
TAV	Título alcoométrico volúmico
TBA	2,4,6-Tribromoanisol
TCA	2,4,6-Tricloroanisol
TCP	2,4,6-Triclorofenol
TeCA	2,3,4,6-Tetracloroanisol
VL	Vasconcelos & Lincke
2D	Dois discos

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

A indústria corticeira sofreu, no final dos anos noventa, uma quebra no negócio devido à contaminação da cortiça com 2,4,6-Tricloroanisol (TCA) que, quando em contacto com o vinho, confere a este um aroma e sabor a mofo e bafio [1]. A Amorim & Irmãos, S.A. (A&I) tem realizado inúmeros projetos de investigação direcionados para esta temática, com o intuito de perceber a origem da contaminação da cortiça e encontrar soluções capazes de detetar, reduzir e erradicar essas contaminações.

É no âmbito desta problemática do TCA que surge a presente dissertação. Direcionada para o produto rolha de champanhe, a tese tem como objetivo estudar a migração de TCA presente na rolha para o vinho, estudar a migração de *off-flavours* exógenos através da rolha para o vinho e verificar o impacto dos *off-flavours da cortiça* no vinho espumante.

1.2 Apresentação da Empresa

Diferenciada pela qualidade, inovação e espírito empreendedor, a Corticeira Amorim, S.G.P.S., S.A. é a maior empresa de produtos de cortiça a nível mundial e a empresa portuguesa mais internacional, marcando presença em mais de cem países e territórios de todos os continentes [2]. Esta encontra-se subdividida em cinco unidades de negócio: matérias-primas, rolhas, revestimentos, aglomerados compósitos e isolamentos. A produção de rolhas é, desde sempre, o *core business* da empresa, onde são feitos grandes investimentos em investigação e desenvolvimento. Com uma produção superior a 5 mil milhões de unidades por ano, assume-se como o maior produtor de rolhas de cortiça a nível mundial e apresenta cerca de 35 % da quota do mercado global da cortiça [3].

A presente dissertação foi realizada na unidade de negócios de rolhas, da qual fazem parte oito unidades industriais (Tabela 1). O Departamento de Investigação e Desenvolvimento (I&D), para além de desenvolver projetos de inovação, dá apoio a todas as unidades industriais, analisando cerca de 900 amostras diariamente. Por forma a conseguir responder às necessidades de cada cliente, o Grupo Amorim produz uma vasta gama de rolhas de cortiça de acordo com o tipo de garrafa e as características de cada vinho a que o seu produto se destina. Todos os produtos A&I respeitam a regulamentação e legislação existentes (Europeia e Americana) para produtos em contacto com géneros alimentícios [4].

Tabela 1 - Unidades Industriais da Amorim & Irmãos, S.A., [3].

Unidade Industrial	Atividade
A&I - Lamas	Produção de rolhas naturais, colmatadas e Acquamark®
Amorim Distribuição (AD)	Marcação e tratamento de rolhas naturais, colmatadas, aglomeradas, Twin Top®, Neutrocork®, Acquamark® e Advantec®
Champcork (CHK)	Produção, marcação e tratamento de rolhas de champanhe
Amorim Top Series (ATS)	Produção de rolhas capsuladas e especialidades
Vasconcelos & Lincke (VL)	Tratamento e escolha de rolhas naturais e colmatadas
Portocork (PK)	Marcação, tratamento, escolha e lavagem de rolhas naturais
De Sousa (DS)	Produção de rolhas Neutrocork® e Helix®
Equipar	Produção, marcação e tratamento de rolhas aglomeradas, Twin Top® e Advantec®

1.3 A cortiça

A cortiça está na vanguarda da tecnologia, ao serviço das aplicações mais inovadoras e avançadas da atualidade. Extraída da casca do sobreiro (*Quercus suber* L.), a cortiça é uma matéria-prima 100 % natural, renovável e biodegradável. Durante o seu período de vida, que pode variar entre os 170 e os 200 anos, o sobreiro pode ser descortiçado, em média, entre 15 a 18 vezes. A nível mundial, 2,1 milhões hm² de floresta são ocupados por esta espécie, assumindo um papel crucial na manutenção do equilíbrio ambiental, não só por promover a infiltração da chuva e prevenir a erosão do solo, como também por promover a retenção de CO₂ (está cientificamente provado que uma rolha de cortiça de calibre 45 x 24 mm retém 6,4 g de CO₂, correspondentes ao carbono incorporado em cada rolha através do processo de fotossíntese [5]). Atualmente, o ritmo de reflorestação dos montados de sobreiro é de 10 000 hm²/ano. Este valor reflete-se na economia, uma vez que Portugal é líder na produção e transformação da cortiça, responsável por 50 % da produção em todo o mundo [3]. Os últimos estudos de consumidor realizados pela Associação Portuguesa da Cortiça (APCOR) demonstram que, em média, 92 % dos consumidores de vinho a nível mundial distingue a cortiça como o seu vedante de eleição [6].

As propriedades dos materiais estão totalmente relacionadas com a sua estrutura. A cortiça, classificada como um material celular, é formada por uma colmeia de células microscópicas de suberina, preenchidas com um gás semelhante ao ar, e é detentora de características

incomparáveis, nomeadamente: impermeabilidade a líquidos e gases; leveza; flexibilidade; resistência ao desgaste e à combustão; isolamento térmico, acústico e vibrático. A composição estrutural da cortiça, que lhe confere elasticidade, os compostos fenólicos complexos que fazem parte da sua estrutura e o ar que se encontra dentro das células mortas que a constituem, garantem que a cortiça confira boa vedação e permita ao vinho o correto envelhecimento em garrafa, tornando a cortiça natural o melhor vedante para um bom vinho [7]. Para além disso, a rolha de cortiça é o único vedante capaz de conciliar o seu alto desempenho com elevada sustentabilidade, já que cada vedante de plástico e cada cápsula de alumínio emitem, respetivamente, 10 e 24 vezes mais CO₂ que uma rolha de cortiça [5].

1.4 A rolha de champanhe

No final do século XVII, o uso da cortiça a um nível pré-industrial aumentou significativamente através da produção de rolhas de cortiça para vinho, particularmente para os famosos vinhos da região de Champanhe, no norte de França [7]. A rolha SPARK® é fabricada na unidade industrial CHK e apresenta um comportamento mecânico e facilidade de engarrafamento de excelência (Figura 1). Especialmente desenhada para vedar champanhes, vinhos espumantes, sidras e cervejas, a rolha de champanhe é considerada uma rolha técnica, constituída por um corpo aglomerado de cortiça ao qual se adiciona, na extremidade em contacto com o vinho, um ou dois discos de cortiça natural [8]. Para além desse formato, a rolha de champanhe pode ser constituída apenas pelo corpo aglomerado ou microgranulado, sem discos adicionados [9]. O tipo de bebida a que se destina é caracterizado por apresentar elevadas pressões internas em garrafa, podendo atingir valores entre 5 a 6 atm à temperatura de 8 °C. Os calibres *standard* 47 x 30,5 mm, 48 x 30,5 mm ou 48 x 31 mm, por apresentarem um diâmetro (30,5 ou 31 mm) superior ao diâmetro das rolhas para vinhos tranquilos (23, 23,5, 24 ou 25 mm), são uma mais-valia no suporte das elevadas pressões internas.



Figura 1 - SPARK®, a rolha de champanhe de dois discos comercializada pela A&I [10].

O processo de produção da rolha de champanhe é iniciado com a preparação do granulado e dos discos. O granulado das rolhas de champanhe e Twin Top® (RCT) é caracterizado por apresentar dimensões entre 3 a 7 mm por proporcionarem maior força e elasticidade à rolha. Estes são obtidos através da trituração de rolhas recicladas e de desperdícios de matéria-prima no processo de produção das rolhas naturais. Para além disso, a primeira cortiça produzida pelo sobreiro, entre os seus 20 e 35 anos de idade, não é adequada para o fabrico de rolhas naturais, sendo aproveitada para trituração e produção de aglomerados [11]. Os granulados utilizados pela CHK para a produção dos corpos RCT podem sofrer dois tipos de tratamentos curativos no que diz respeito ao TCA: *Fluidized Bed Technology* (FBT) ou o processo *Rate of Optimal Steam Application* (ROSA®) combinado com um tratamento à base de microondas (MO).

O tratamento FBT tem por base o conceito de funcionamento de um reator de leito fluidizado. Neste processo, um fluxo de vapor passa através do granulado RCT, criando uma condição de mistura rápida que reduz significativamente os níveis de TCA [5]. Este tratamento apresenta uma eficácia de cerca de 72 % na remoção de TCA dos corpos RCT.

O ROSA® é o principal tratamento curativo implementado na A&I, atingindo percentagens de remoção de TCA superiores a 80 % [1]. Este tratamento consiste numa destilação a vapor, utilizando temperaturas acima dos 60 °C de modo a volatilizar o TCA que é posteriormente arrastado através do vapor de água. Neste processo, são tratados todos os granulados de cortiça destinados ao fabrico de aglomerados e de rolhas técnicas Twin Top®. Os granulados destinados aos corpos RCT, quando tratados pelo processo ROSA®, passam também pelo tratamento MO que, para além de aumentar a eficácia da remoção de TCA, permite manter as características de massa volúmica e humidade do RCT. Este sistema, através de ondas eletromagnéticas, origina uma geração interna de calor que promove fenómenos de evaporação da água presente na matéria, possibilitando uma volatilização de metabolitos através da ação do vapor [5]. Os tratamentos ROSA e MO, quando aplicados em conjunto aos granulados dos corpos RCT, apresentam uma eficácia de cerca de 89 % na remoção de TCA.

Após o tratamento dos granulados, estes passam pelo processo de moldação que, através da mistura com uma cola aprovada para contacto alimentar, formam um corpo cilíndrico. De seguida, os discos, obtidos da cortiça delgada, passam por um sistema de escolha eletrónica que, com recurso a uma câmara, determina o lado do disco que entrará em contacto com o vinho. O disco de interior é colado ao RCT e, por sua vez, o disco de espelho é colado ao disco de interior. É de salientar que o disco de espelho, que entra em contacto direto com o vinho, é de melhor qualidade em comparação com o disco de interior.

Depois de montadas as rolhas, estas permanecem num forno a 100 °C durante 13 min para secagem. Após estabilização, seguem-se os acabamentos mecânicos para alisamento da superfície lateral e dos topos, de acordo com o calibre pretendido. De modo a evitar um

desarrolhamento indesejado, provocado pela pressão do gás no interior da garrafa, é feito um chanfro na extremidade oposta aos discos de modo a acomodar uma peça metálica denominada *muselet* [10]. As rolhas passam por uma escolha feita de acordo com a classe visual e são marcadas a fogo ou, mais recentemente, a laser, conforme o pedido do cliente. A fase final do processo de produção é a aplicação do tratamento de superfície, seguindo-se a embalagem e expedição do produto.

Na operação de engarrafamento, o diâmetro inicial da rolha é reduzido para cerca de metade, enquanto que na operação de desengarrafamento a rolha é submetida a diversos esforços de flexão e de torção. Desta forma, a rolha de champanhe tem de apresentar excelentes características físico-mecânicas, necessitando de uma fabricação bastante cuidada e de um controlo de qualidade rigoroso [11].

1.5 Haloanisóis e outros *off-flavours*

Apesar das características únicas das rolhas de cortiça, a indústria corticeira sofreu, no final dos anos noventa, uma quebra no negócio por estas conferirem ao vinho um aroma e sabor a mofo e bafio [1]. Esses desvios sensoriais são uma consequência de microrganismos presentes no meio ambiente que, quando em contacto com halofenóis (amplamente utilizados no passado como principal ingrediente dos biocidas aplicados nas árvores para controlar as pragas de insetos), desenvolvem um mecanismo de defesa que leva à produção de haloanisóis [12]. Os haloanisóis são divididos em dois grupos: cloroanisóis e bromoanisóis.

O maior inimigo da cortiça é o 2,4,6-Tricloroanisol (TCA) e foi o primeiro composto a ser identificado como causa do “sabor a rolha”, sendo, no entanto, importante referir que este não apresenta qualquer ameaça à saúde humana. Quando presente na atmosfera ou em água, em contacto com rolhas de cortiça ou com o vinho, este composto é facilmente adsorvido pela cortiça [5]. A maior parte do TCA presente nas rolhas de cortiça contaminadas provém da casca do sobreiro, ainda antes da fase de descortiçamento, podendo também haver uma contaminação após a colheita e uma contaminação secundária das pranchas de cortiça [13].

Este composto é sintetizado por microrganismos, em especial pelos fungos filamentosos, através da biometilação do 2,4,6-Triclorofenol (TCP) em TCA pela ação da enzima Clorofenol *O*-metiltransferase (CPOMT). O mecanismo de formação do TCA encontra-se apresentado, de seguida, na Figura 2. A utilização em larga escala do pesticida TCP levou a uma vasta contaminação dos montados de sobreiro e, por consequência, da cortiça, bem como das madeiras presentes em adegas, já que este era empregue no tratamento e conservação das mesmas.

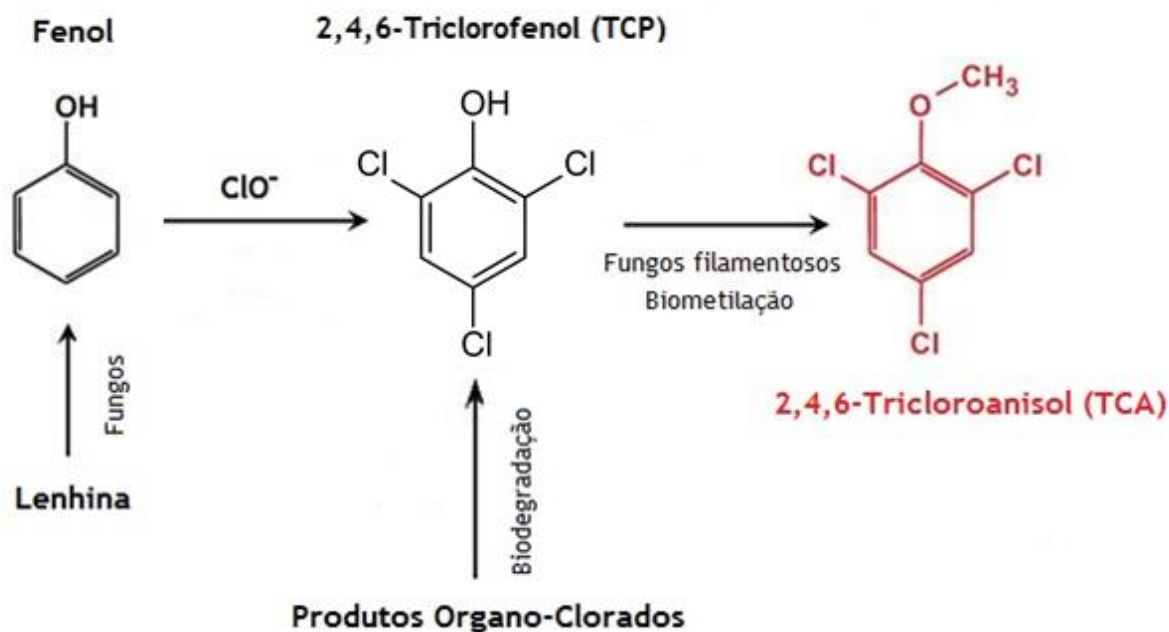
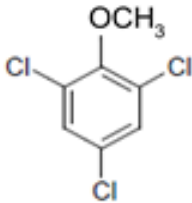
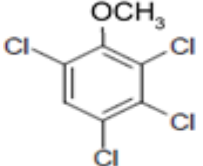
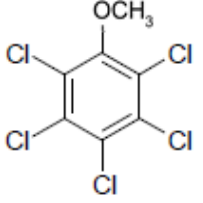
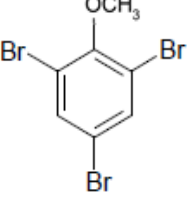


Figura 2 - Mecanismo de formação do TCA. Adaptado de [14],[15].

Também os compostos 2,3,4,6-Tetracloroanisol (TeCA), Pentacloroanisol (PCA) e 2,4,6-Tribromoanisol (TBA) são conhecidos por provocarem um aroma fúngico [13]. Na Tabela 2 encontram-se apresentados os limites de detecção sensorial em água e em solução alcoólica, bem como a estrutura química de cada componente referido anteriormente.

Tabela 2 - Estrutura química e limite de detecção sensorial, em água e em solução alcoólica, dos principais haloanisóis envolvidos na contaminação do vinho pela rolha de cortiça [16].

Componente	Estrutura	Limite de detecção sensorial	
		Em água	Em solução alcoólica
2,4,6-TCA		0,03 - 0,3 ng/L	1,5 - 3 ng/L
2,3,4,6-TeCA		4 ng/L	✓ Vinhos brancos e tintos: 10 - 15 ng/L ✓ Espumantes: 5 ng/L
PCA		Pouco aromatizado > 50 g/L	Pouco aromatizado > 50 g/L
2,4,6-TBA		0,008 - 0,03 ng/L	3,4 ng/L

Os desvios sensoriais observados e os agentes causadores dos mesmos podem contribuir negativa ou positivamente para o vinho, dependendo da intensidade do desvio e da natureza e concentração dos agentes. As análises sensoriais, essencialmente em água, permitem detetar, para além do TCA, uma enorme variedade de aromas presentes na cortiça, nomeadamente: químico, putrefação, vegetal, mofo, cera, cola, entre muitos outros (Figura 3).

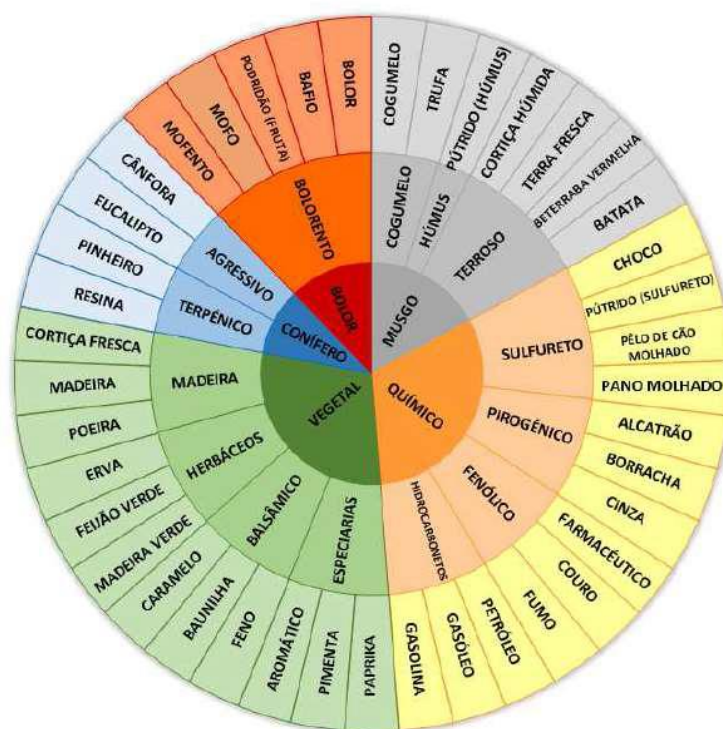


Figura 3 - Roda dos desvios sensoriais da cortiça [17].

1.6 Organização da Tese

A presente tese encontra-se dividida em sete capítulos. No primeiro capítulo, Introdução, é feito um enquadramento e apresentação do projeto e da empresa. Por forma a enquadrar o problema abordado na dissertação, é feita uma abordagem à cortiça, à rolha de champanhe e aos haloanisóis e outros *off-flavours*.

O segundo capítulo, *Contexto e Estado da Arte*, centra-se na revisão bibliográfica de estudos realizados até aos dias de hoje, relacionados com a temática desta tese, e nos processos curativos implementados na A&I, fazendo um enquadrando teórico do projeto.

O terceiro, quarto e quinto capítulos (Migração de TCA na rolha de champanhe de dois discos, Migração de *off-flavours* exógenos através da cortiça e Impacto dos *off-flavours* no vinho espumante, respetivamente) são dedicados à exposição das respetivas metodologias aplicadas nesses estudos, bem como a apresentação e discussão dos resultados obtidos.

No sexto capítulo, são apresentadas as conclusões suportadas pelos resultados obtidos no terceiro, quarto e quinto capítulos.

Por fim, o sétimo capítulo é dedicado à avaliação do trabalho realizado, referindo os objetivos cumpridos, outros trabalhos efetuados em simultâneo com o desenvolvimento do projeto, as limitações que surgiram no decorrer da dissertação, sugestões para trabalhos futuros e a apreciação final do trabalho desenvolvido.

1.7 Contributos do Trabalho

Desde a sua fundação no ano 2000, o I&D tem vindo a desenvolver diversos projetos focados no estudo da migração do TCA e de outros *off-flavours* no produto rolha de cortiça, com o objetivo de encontrar soluções para a sua redução e, preferencialmente, a sua erradicação.

Embora as rolhas de cortiça sejam consideradas como as principais fontes de contaminação dos vinhos, existem outros agentes de contaminação presentes no transporte e armazenamento dos vinhos engarrafados. Este projeto de investigação teve como objetivo o estudo da migração de TCA na rolha de champanhe de dois discos, a migração de *off-flavours* presentes na atmosfera para o vinho, através da cortiça, e o impacto destes no mesmo.

Em rolhas com discos, era conhecida a existência de migração de TCA do disco de espelho para o vinho [18]. Contudo, era inexistente o conhecimento sobre a migração através do disco de interior e do corpo RCT, bem como a contaminação através de ambientes contaminados.

Os resultados obtidos fornecem à A&I um conhecimento mais aprofundado da migração dos compostos contaminantes presentes na cortiça e, eventualmente, na atmosfera, e possibilita a prevenção de futuros problemas de contaminação dos vinhos. Os trabalhos realizados permitem, também, perceber qual o impacto dos *off-flavours* no vinho espumante ao longo do tempo.

2 Contexto e Estado da Arte

O aroma e sabor a mofo e bafio nos vinhos provocado pelos vedantes de cortiça é um problema grave na indústria vitivinícola. Esta problemática afeta também o negócio da indústria corticeira, já que as rolhas de cortiça, que representam a maior área de negócio, podem ser substituídas por outro tipo de vedantes. De todos os compostos conhecidos por provocarem desvios sensoriais no vinho, designados *off-flavours*, o TCA é o mais importante e é nele que está centrado o maior número de estudos e projetos, com o intuito de encontrar soluções para a sua redução ou, preferencialmente, erradicação.

Análises de TCA realizadas pelo laboratório do *Enological Technological Services* (ETS) às remessas de rolhas naturais provenientes dos membros do *Cork Quality Council* (CQC), nos Estados Unidos, demonstram que até 2017 existiu uma redução de cerca de 94 % (Figura 4) dos níveis de TCA face aos resultados obtidos, pela primeira vez, em 2001 [19].

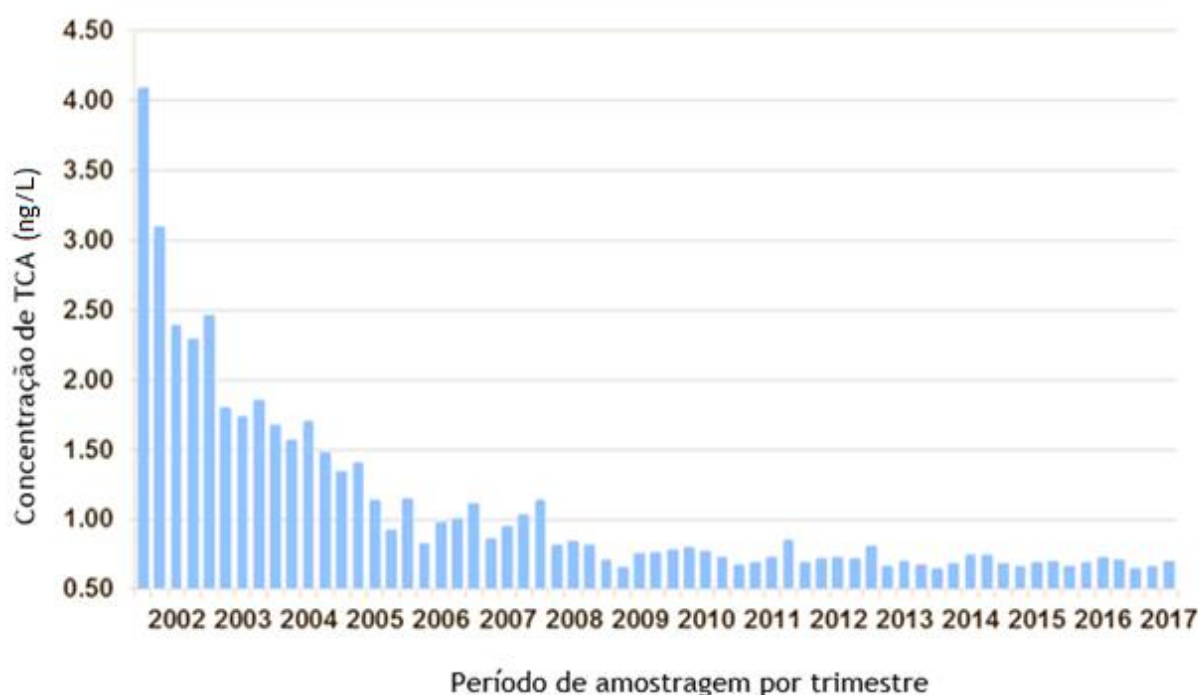


Figura 4 - Evolução da concentração média de TCA (ng/L) das rolhas naturais do grupo CQC desde 2001 até 2017. Adaptado de [19].

A rolha SPARK® é a rolha de champanhe comercializada pela A&I e fabricada na unidade de rolhas CHK. Esta é considerada uma rolha técnica, constituída por dois discos de cortiça natural unidos a um corpo aglomerado RCT. A análise de TCA aos discos é feita através dos métodos de *sniffing* e de microextração em fase sólida com cromatografia gasosa por captura de eletrões ou por espetrometria de massa (SPME-GC-ECD/MS). O método de *sniffing* consiste na exposição dos discos a uma temperatura superior à temperatura de volatilização do TCA, possibilitando

ao operador a identificação sensorial do composto. Enquanto que no método de *sniffing* os resultados são qualitativos, isto é, positivos ou negativos conforme a percepção sensorial, no método SPME-GC-ECD/MS obtêm-se resultados quantitativos da concentração de TCA extraível na solução hidroalcoólica (12 % etanol, v/v), após atingir o equilíbrio ao fim de 24 h de maceração.

Em 2016, o I&D desenvolveu um estudo com o objetivo de validar o sistema de *sniffing* industrial da CHK. Os resultados demonstraram que este é um método expedito, com uma rentabilidade média de 3 000 rolhas/h, a 2 pessoas, e bastante eficaz para avaliar rolhas com desvios sensoriais. Num estudo com cerca de 50 000 rolhas analisadas, foram detetadas 2,5 % de rolhas com desvios sensoriais mas nenhuma rolha sensorialmente negativa (aprovada na operação de *sniffing*) apresentou TCA na posterior análise química [20].

Investigações feitas ao longo dos anos demonstram que o TCA não se encontra localizado de forma uniforme ao longo da matriz da cortiça e que a sua taxa de migração é lenta. O TCA presente à superfície da rolha ou próximo dela, ou quando presente nas lenticelas onde o vinho entra em contacto direto, migra com maior facilidade para o vinho. Por outro lado, o restante TCA presente na rolha tem menor probabilidade de migrar para o vinho durante o tempo normal de engarrafamento, dado que se encontra no interior da matriz da cortiça [21]. Desta forma, estudos defendem que os tratamentos aplicados para a redução da quantidade de TCA nas rolhas de cortiça necessitam de remover apenas o TCA que é extraível durante o período normal de engarrafamento [13]. Para além disso, é defendida a ideia de que os processos de tratamento destinados a rolhas acabadas ou a granulados de cortiça, para posterior utilização no fabrico de rolhas técnicas, têm maior probabilidade de sucesso do que se forem aplicados a placas de cortiça onde irão surgir, no decorrer do processo de produção do vedante, novas superfícies fortemente contaminadas [21].

O processo SuperROSA® (SR) surge de uma melhoria do processo ROSA®, onde foram implementadas algumas alterações ao nível de temperatura e capacidade de remoção de componentes voláteis, conseguindo-se uma extração de TCA ainda mais elevada. O I&D iniciou em 2017 um projeto que tem como propósito verificar a eficiência do SR na redução de TCA dos discos de cortiça natural para rolhas de champanhe [22]. Uma vez que os discos de cortiça natural são colados ao corpo RCT e depois são retificados para o calibre pretendido, expondo novas superfícies da cortiça, durante o estágio foi feita uma avaliação da eficácia do SR nos discos após retificação dos mesmos e ao longo do tempo.

São vários os fatores que podem estar envolvidos na transmissão de compostos responsáveis pelo “sabor a rolha” da cortiça para o vinho, nomeadamente: as solubilidades dos compostos e a sua afinidade com a superfície e o interior da cortiça, a localização dos compostos na rolha, a cinética de migração dos compostos através da matriz da cortiça, o volume de vinho em

contacto com o vedante, entre outros. O TCA é uma substância química estável que não se degrada significativamente no vinho ao longo do tempo. Por consequência, a concentração no vinho apenas varia com o tempo se estiverem envolvidos processos físicos, como a dessorção e absorção pela rolha de cortiça. Devido ao contacto direto do vinho com a superfície da rolha e ao efeito da humidade e do álcool, podem existir diferenças entre a capacidade de absorção da superfície e da parte interior da cortiça. Além disso, estudos referem que os tratamentos de superfície com silicone e parafina potenciam a capacidade hidrofóbica da superfície da cortiça, o que proporciona uma maior retenção de compostos não-polares, como por exemplo o TCA [23].

Em algumas caves, vinhos que nunca estiveram em contacto com a cortiça apresentaram valores positivos de TCA, o que demonstra a existência de outras fontes de contaminação [24]. Deste modo, a atribuição do fator de exclusividade da rolha de cortiça como agente contaminante dos vinhos é demasiado simplista e, por isso, torna-se necessária uma análise mais cuidada e conclusiva.

Têm vindo a decorrer alguns estudos na comunidade científica com o objetivo de verificar a migração de *off-flavours* através de diferentes vedantes para o vinho engarrafado. Com o intuito de estudar a migração de 2,4,6-Tricloroanisol-deuterado (d_5 -TCA) para o vinho, o interior de rolhas de cortiça natural foi contaminado artificialmente com este composto e, após 9 dias de engarrafamento, verificou-se que o d_5 -TCA adicionado não migrou para o vinho [25]. Estes resultados foram concordantes com um estudo semelhante, mas com um período de ensaio de 4 meses [26].

Também a migração de d_5 -TCA atmosférico através das rolhas de cortiça natural, Neutrocork e vedantes sintéticos Nomacorc Classic para os vinhos foi analisada, em duas condições de ensaio diferentes: enquanto que na primeira as garrafas foram colocadas numa câmara contaminada com d_5 -TCA e TCP durante 6 meses [26], na segunda as garrafas foram colocadas numa atmosfera contaminada com d_5 -TCA durante um mês [25]. Na primeira condição de ensaio, 15 garrafas foram analisadas tendo-se verificado que os vinhos vedados com Nomacorc foram contaminados com aqueles compostos [26]. Estes resultados são concordantes com os obtidos na segunda condição de ensaio, onde ao fim do primeiro mês, apesar dos vinhos não estarem contaminados, as rolhas sintéticas foram as únicas que apresentaram níveis de migração de d_5 -TCA ao longo do primeiro terço do vedante [25]. Ambos os estudos vão de encontro a um artigo que defende que a rolha de cortiça é uma barreira efetiva à migração de d_5 -TCA da atmosfera para o vinho e que, em 90 % dos casos, o d_5 -TCA ficava absorvido no primeiro terço da rolha [27].

Em 2011 foi realizado um estudo com o objetivo de avaliar a permeabilidade de diferentes vedantes ao d_5 -TCA. Este estudo incluiu rolhas de cortiça natural (classe visual superior), rolhas

de cortiça microaglomeradas (Neutrocork) e rolhas sintéticas (Nomacorc Classic) em garrafas com solução hidroalcoólica (12 % etanol, v/v), fechadas numa atmosfera contaminada com d₅-TCA, permitindo que, nas análises posteriores, este seja distinguido do TCA derivado da cortiça. Após 6, 12, 24 e 36 meses, foram analisadas por SPME-GC-MS as soluções e os vedantes, divididos em três frações (inferior, meio e superior). Os resultados demonstraram que valores de concentração elevados de d₅-TCA foram encontrados essencialmente nos segmentos superiores das rolhas de cortiça natural e microaglomeradas, mas que, no entanto, ambas são barreiras efetivas à transmissão de contaminantes exógenos para os vinhos, já que estes não se encontraram contaminados. Por outro lado, os vedantes sintéticos não cumprem de forma eficiente a mesma função, já que o d₅-TCA foi capaz de penetrar as rolhas e contaminar os vinhos [28].

No ano 2015, a universidade de Geisenheim iniciou um estudo semelhante ao mencionado anteriormente, com o objetivo de verificar as propriedades de barreira de 12 vedantes de vinho, nomeadamente: rolha de cortiça natural de alta e baixa qualidade; rolhas aglomeradas de alta e baixa qualidade; vedantes sintéticos Nomacorc BIO Select 500, Nomacorc BIO Select 100 e Nomacorc Classic +; cápsulas de rosca BVS Tin/Saran, BVS Saranex, BVS Twister, MCA e Vinolok. Garrafas de vinho foram obturadas com os vedantes em estudo e armazenadas em barris de 125 L com duas condições de atmosfera contaminada: condição média, com concentração de 45 ng/L_{ar} de d₅-TCA no ar à temperatura de 17 °C; e condição intensa, com 450 ng/L_{ar} de d₅-TCA no ar à temperatura de 26 °C. Após 6, 12, 24 e 36 meses foram realizadas análises de d₅-TCA aos vinhos e às macerações em solução hidroalcoólica (12 % etanol, v/v) dos segmentos superior e inferior dos vedantes, isto é, em contacto com a atmosfera contaminada e com o vinho, respetivamente. Após 24 meses de ensaio, tanto as rolhas de cortiça natural como as rolhas aglomeradas e BVS Tin/Saran demonstraram ser impermeáveis ao d₅-TCA para o vinho, enquanto que os vedantes sintéticos Nomacorc, MCA e Vinolok revelaram ser os mais permeáveis. Em condições intensas de armazenamento, os *liners* Tin/Saran impedem a migração de d₅-TCA para o vinho, já que ao fim de 24 meses este não foi detetado. Relativamente ao efeito da temperatura de armazenamento, concluiu-se que para valores de temperatura mais elevados, o estado de equilíbrio da migração de d₅-TCA é atingido mais rapidamente e que ao fim de 24 meses os processos de dessorção já ocorreram, com perdas de d₅-TCA para o ar [29].

À semelhança do que foi feito na universidade de Geisenheim, o departamento de I&D da A&I está a desenvolver, desde 2016, um estudo que pretende verificar a existência de migração de *off-flavours* exógenos para o interior da garrafa através da cortiça. No entanto, este estudo contempla também rolhas de champanhe, como é o caso das rolhas de um e de dois discos, rolha microgranulada (granulado com cerca de 0,5 a 1 mm) e aglomerado RCT (granulado com

cerca de 3 a 7 mm), uma vez que estas ainda não tinham sido alvo deste tipo de estudos. No total, são sete os vedantes em estudo, nomeadamente: rolha de cortiça natural 45 x 24 mm flor; rolha de champanhe de dois discos; rolha de champanhe de um disco; rolha microgranulada; rolha aglomerada; vedante sintético Nomacorc classic +; e cápsula de rosca (Saran). Os dois últimos servirão como referências uma vez que o Nomacorc é permeável ao oxigénio e a compostos voláteis e a cápsula de rosca é impermeável [30]. Com um tempo de ensaio previsto de 12 anos e tempos de análise a cada 2 anos, é objetivo da presente dissertação avaliar os resultados correspondentes ao primeiro tempo de análise (24 meses).

O desempenho dos discos como barreira ao TCA em rolhas técnicas foi avaliado pelo *Cork Quality Council* (CQC). Este estudo contou com a análise de 1 152 amostras de garrafas com rolhas técnicas 1+1 (com um disco no topo e na base e granulado no corpo intermédio) para vinhos tranquilos, compostas por combinações de discos e de corpos aglomerados de baixa e de alta concentração de TCA. Aos 24 meses de ensaio, as análises efetuadas aos vinhos demonstraram que discos de boa qualidade previnem a transferência de TCA para o vinho, independentemente da qualidade do corpo aglomerado [18].

Dada a falta de informação sobre o desempenho das rolhas de champanhe de dois discos como barreira ao TCA, o I&D iniciou em 2017 um projeto que tem como objetivo estudar a migração desse composto na rolha de champanhe em vinho espumante ao longo do tempo. Para o efeito, foram amostrados 6 grupos de rolhas com diferentes distribuições de TCA nos corpos RCT e nos discos de interior e de espelho. Com o conhecimento do valor de TCA presente em cada disco, as rolhas foram numeradas e procedeu-se ao engarrafamento com vinho espumante em garrafas de 750 mL, armazenadas na horizontal à temperatura ambiente [31]. Após 6 meses, as análises de TCA aos vinhos por GC-MS demonstraram que nas rolhas cujos discos de interior estavam contaminados, ocorreu migração para os vinhos em 50 % das amostras. Essa contaminação ocorreu nas duas gamas de concentração de TCA do disco de interior e com valores variáveis e por isso não parece haver relação direta entre a concentração de TCA do disco de interior e do vinho. Por outro lado, nas rolhas cujos discos de espelho estavam contaminados, a contaminação do vinho ocorreu nas duas gamas de concentração de TCA do disco de espelho, mas com cinéticas diferentes. Enquanto que na gama de concentração de TCA inferior a 5 ng/L existiu contaminação em 40 % dos vinhos, com um valor máximo de 2,5 ng/L, na gama de concentração de TCA com valores superiores a 5 ng/L existiu migração desse composto para o vinho em 100 % dos casos e com 80 % desses valores superiores a 5,5 ng/L. Os resultados do primeiro ponto de análise demonstram que existe relação direta entre a concentração de TCA do disco de espelho e a concentração de TCA do vinho [31]. É objetivo da presente dissertação avaliar os resultados após 12 meses de ensaio.

3 Migração de TCA na rolha de champanhe de dois discos

Neste capítulo descreve-se a metodologia usada no estudo da migração de TCA na rolha de champanhe de dois discos, bem como os resultados obtidos. Este projeto foi iniciado pelo I&D em 2017 e tem uma duração prevista de 48 meses, com medições periódicas aos 6, 12, 24 e 48 meses [31]. Uma vez que o primeiro ponto de análise já tinha sido efetuado, no período de estágio apenas se realizou o segundo ponto de análise, 12 meses após o início do ensaio.

3.1 Metodologia

Numa primeira fase, acabaram-se rolhas de champanhe segundo diferentes intervalos de concentração de TCA. Para isso, amostraram-se discos de lotes positivos e realizaram-se análises individuais de TCA por SPME-GC-ECD, de modo a agrupá-los nas seguintes gamas de concentração:

- TCA < 0,5 ng/L, considerado não detetável (ND);
- 0,5 ng/L < TCA < 5 ng/L;
- TCA > 5 ng/L.

Amostraram-se, também, corpos RCT provenientes de dois lotes de granulado, com as seguintes gamas de TCA:

- TCA < 2 ng/L (lote A);
- 2ng/L < TCA < 10 ng/L (lote B).

A amostragem dos corpos RCT foi realizada de acordo com as análises de TCA aos lotes de granulado, cujos valores das estatísticas descritivas se encontram apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores de TCA nos lotes de RCT.

RCT (lote)	TCA (ng/L)		
	Média	Mínimo	Máximo
TCA < 2 ng/L (A)	0,7	0,6	0,7
2 ng/L < TCA < 10 ng/L (B)	5,8	3,0	8,5

Uma vez amostrados os corpos RCT e conhecidos os valores de TCA dos discos, prepararam-se 6 grupos de rolhas de champanhe de dois discos (2D), conforme esquematizado na Figura 5, de acordo com os intervalos de concentração de TCA a seguir apresentados:

1. Rolha 2D com o RCT do lote A e os dois discos ND;
2. Rolha 2D com o RCT do lote B e os 2 discos ND;
3. Rolha 2D com o RCT do lote A, o disco de espelho ND e o disco interior com:
 - a. TCA < 5 ng/L;
 - b. TCA > 5 ng/L.
4. Rolha 2D com o RCT do lote A, o disco interior ND e o disco de espelho com:
 - a. TCA < 5 ng/L;
 - b. TCA > 5 ng/L.

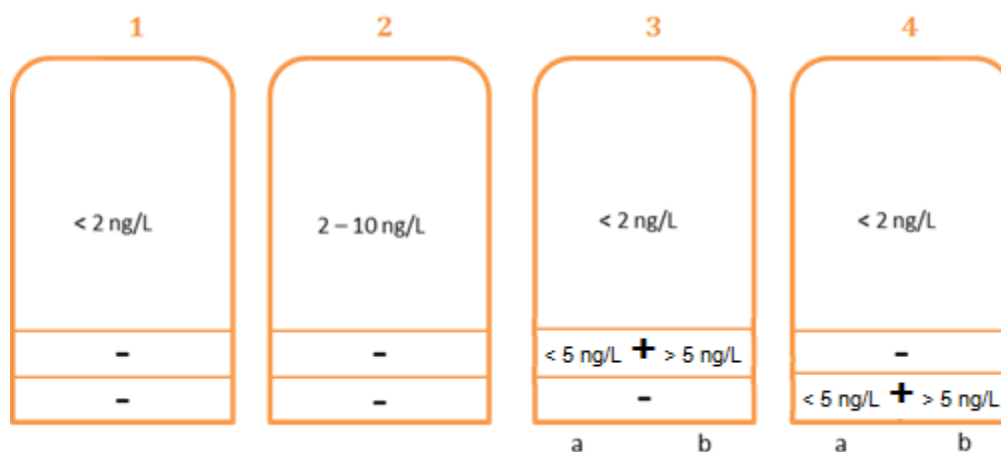


Figura 5 - Esquema de distribuição de TCA (ng/L) dos diferentes grupos de rolhas de champanhe em estudo [31].

As rolhas foram numeradas na lateral do corpo RCT e o engarrafamento foi realizado em junho de 2017 nas caves São Domingos com um vinho espumante, em garrafas de 750 mL. Uma vez que neste projeto se pretende estudar 6 grupos de rolhas e realizar 4 tempos de análise com 5 repetições, engarrafaram-se 123 garrafas. Estas foram armazenadas na horizontal e à temperatura ambiente.

As rolhas do grupo 1 foram numeradas de 1 a 23 e as do grupo 2 de 24 a 43. Na Tabela 4 encontra-se apresentada a restante numeração com a respetiva concentração de TCA dos discos.

Tabela 4 - Valores de TCA nos discos das rolhas dos grupos 3a, 3b, 4a e 4b.

Grupo 3a			Grupo 3b			Grupo 4a			Grupo 4b		
Rolha	TCA interior (ng/L)	TCA espelho (ng/L)	Rolha	TCA interior (ng/L)	TCA espelho (ng/L)	Rolha	TCA interior (ng/L)	TCA espelho (ng/L)	Rolha	TCA interior (ng/L)	TCA espelho (ng/L)
44	1,8	ND	64	6,0	ND	84	ND	1,4	104	ND	7,2
45	1,8	ND	65	9,4	ND	85	ND	1,0	105	ND	11,0
46	2,2	ND	66	7,4	ND	86	ND	3,1	106	ND	7,4
47	3,4	ND	67	9,6	ND	87	ND	1,9	107	ND	8,2
48	1,0	ND	68	10,5	ND	88	ND	2,8	108	ND	12,1
49	1,7	ND	69	5,9	ND	89	ND	1,4	109	ND	41,9
50	1,1	ND	70	7,3	ND	90	ND	4,9	110	ND	5,9
51	1,8	ND	71	6,2	ND	91	ND	1,0	111	ND	11,0
52	4,4	ND	72	6,3	ND	92	ND	3,0	112	ND	7,4
53	1,9	ND	73	5,8	ND	93	ND	1,2	113	ND	6,0
54	2,3	ND	74	5,7	ND	94	ND	3,6	114	ND	7,7
55	4,7	ND	75	61,8	ND	95	ND	2,2	115	ND	7,4
56	1,1	ND	76	9,1	ND	96	ND	1,0	116	ND	5,1
57	1,1	ND	77	6,9	ND	97	ND	3,3	117	ND	5,3
58	1,5	ND	78	7,0	ND	98	ND	1,7	118	ND	14,3
59	4,4	ND	79	25,8	ND	99	ND	3,8	119	ND	13,9
60	1,5	ND	80	8,5	ND	100	ND	1,4	120	ND	6,8
61	1,5	ND	81	8,7	ND	101	ND	3,8	121	ND	6,1
62	4,5	ND	82	5,1	ND	102	ND	1,7	122	ND	7,7
63	1,4	ND	83	38,8	ND	103	ND	1,2	123	ND	5,4

O primeiro ponto de análise foi realizado aos 6 meses, em dezembro de 2017. No decorrer da presente dissertação, foi executado o segundo ponto de análise, correspondente aos 12 meses de ensaio, onde foram amostradas 28 garrafas distribuídas pelos diferentes grupos e se procedeu à análise de TCA dos vinhos e dos corpos RCT das respetivas rolhas (os valores de TCA dos discos já eram conhecidos).

O procedimento foi igual para todas as garrafas, sendo que o primeiro passo foi pipetar 10 mL de vinho diretamente das garrafas na posição vertical para um *vial* de 20 mL com 3 g de NaCl, devidamente identificado. Esta amostra foi recolhida diretamente da garrafa por forma a evitar possíveis contaminações provocadas pela rolha no gargalo. Adicionou-se ao *vial* 10 mL de padrão interno d_5 -TCA e quantificou-se o TCA presente no vinho pelo método de análise SPME-GC-MS (procedimento descrito no Anexo 1). Para além da análise química, foi realizado um ensaio sensorial descritivo. Para isso, encheu-se um copo com cerca de 20 mL de vinho por cada garrafa, tapou-se com uma placa de vidro e deixou-se repousar durante 10 min para que o painel de provadores pudesse realizar a prova.

De seguida, cortaram-se os corpos RCT das rolhas e colocaram-se a macerar em solução hidroalcoólica (12 % etanol, v/v) durante 24 h. Posteriormente, pipetou-se 10 mL da solução de cada macerado para um *vial* com 3 g de NaCl, adicionou-se 10 mL de padrão interno d_5 -TCA e quantificou-se o TCA extraível pelo método de análise SPME-GC-MS (Anexo 1).

3.2 Resultados e Discussão

Os resultados de TCA foram obtidos com o método de análise de cloroanisóis na gama de trabalho de 0,5 a 5,5 ng/L (Anexo 1). Apenas para ter uma ideia da ordem da grandeza, os resultados superiores a 5,5 ng/L foram obtidos por extrapolação.

Nos grupos 1 e 2 pretendia-se avaliar a existência de migração de TCA a partir do RCT para o vinho, uma vez que ambos tinham discos ND, mas corpos RCT com TCA inferior a 2 ng/L e de 2 a 10 ng/L (valores de análise aos lotes de granulado do RCT), respetivamente. As rolhas dos grupos 3a e 3b tinham em comum o facto do disco de espelho ser ND e o disco de interior estar contaminado com TCA, com o objetivo de verificar a existência, ou não, de contaminação dos vinhos proveniente do disco de interior. Por outro lado, as rolhas dos grupos 4a e 4b tinham ambas o disco de interior ND e o disco de espelho contaminado com TCA de forma a estudar a contaminação dos vinhos através do disco de espelho. Enquanto que as rolhas dos grupos 3a e 4a apresentavam o respetivo disco contaminado com uma concentração entre 0,5 e 5 ng/L, as rolhas dos grupos 3b e 4b tinham o respetivo disco contaminado com uma concentração superior a 5 ng/L.

Os resultados após 6 meses de engarrafamento encontram-se apresentados na Tabela 5 e na Figura 6. Aos 6 meses, verificou-se que nas rolhas em que o disco de interior estava contaminado com TCA (grupo 3) houve migração para os vinhos em 50 % das amostras (5 em 10). Essa contaminação ocorreu nas duas gamas de concentração de TCA do disco de interior e com valores variáveis e, por isso, não parece haver relação direta entre a concentração de TCA do disco de interior e a concentração de TCA do vinho. Nas rolhas em que o disco de espelho estava contaminado com TCA (grupo 4), houve migração para os vinhos em 73 % das amostras (8 em 11). Essa contaminação ocorreu nas duas gamas de concentração de TCA do disco de espelho, mas com cinéticas diferentes. Na gama de concentração de TCA do disco de espelho de 0,5 ng/L a 5 ng/L (grupo 4a) existiu contaminação em 40 % dos respetivos vinhos (2 em 5) com um valor máximo de 2,5 ng/L, mas na gama de TCA do disco de espelho com valores superiores a 5 ng/L (grupo 4b) existiu migração desse composto para o vinho em 100 % dos casos (6 em 6) e com concentração de TCA superior a 5,5 ng/L em 80 % dos casos. Existe, por isso, relação direta entre a concentração de TCA do disco de espelho e a concentração de TCA do vinho.

Na Tabela 5 é possível verificar que as rolhas 29 e 84 foram reagrupadas em novos grupos após o período de ensaio. A rolha 29, inicialmente identificada como sendo do grupo 2, apresentou TCA no respetivo vinho e, por esse motivo, procedeu-se à repetição da análise do disco de espelho. O valor obtido foi de 3,9 ng/L, pelo que essa rolha foi reagrupada no grupo 4a. A rolha 84, inicialmente identificada como sendo do grupo 4a, apresentou no respetivo vinho um valor de TCA (6,2 ng/L) bastante superior ao do disco de espelho (1,4 ng/L) e, por isso, procedeu-se à repetição da análise deste último, para o qual se obteve um valor de 14,5 ng/L. Essa rolha foi, assim, novamente identificada como sendo do grupo 4b.

Seria de esperar que os corpos RCT dos grupos 1, 3 e 4 tivessem valores de TCA entre 0,5 e 2 ng/L, e que os corpos RCT do grupo 2 tivessem valores de TCA entre 2 e 10 ng/L, o que não se verificou. De facto, tanto aos 6 como aos 12 meses, observou-se que existe uma grande variabilidade nos valores de TCA dos corpos RCT em todos os grupos e que a análise inicial de TCA aos dois lotes de aglomerados utilizados (Tabela 3) não é refletida nos valores de TCA dos corpos RCT individuais (Tabela 5). Esta diferença pode dever-se à passagem do aglomerado por vários processos físicos até à formação do corpo RCT, levando à redução dos valores de TCA.

Tabela 5 - Valores de TCA das rolhas (corpos RCT e discos) e vinhos aos 6 meses.

Grupo	Rolha	N° sequencial	TCA corpo* (ng/L)	TCA interior** (ng/L)	TCA espelho** (ng/L)	TCA vinho* (ng/L)
1	1	1	ND	ND	ND	ND
	2	2	ND	ND	ND	ND
	3	3	ND	ND	ND	ND
	4	4	ND	ND	ND	ND
	5	5	ND	ND	ND	ND
2	24	6	0,8	ND	ND	ND
	25	7	ND	ND	ND	ND
	26	8	ND	ND	ND	ND
	27	9	ND	ND	ND	ND
3a	45	10	ND	1,8	ND	1,8
	50	11	ND	1,1	ND	ND
	51	12	ND	1,8	ND	ND
	52	13	1,1	4,4	ND	0,9
	54	14	1,0	2,3	ND	ND
3b	64	15	1,3	>5,5 (5,96) [†]	ND	ND
	67	16	2,2	>5,5 (9,56) [†]	ND	1,9
	68	17	1,0	>5,5 (10,51) [†]	ND	1,7
	71	18	ND	>5,5 (6,22) [†]	ND	ND
	75	19	0,9	>5,5 (61,77) [†]	ND	1,5
4a	29 [‡]	20	ND	ND	3,9	2,5
	85	21	ND	ND	1,0	ND
	86	22	0,7	ND	3,1	1,7
	87	23	ND	ND	1,9	ND
	88	24	ND	ND	2,8	ND
4b	84 [‡]	25	ND	ND	>5,5 (14,5) [†]	>5,5 (6,2) [†]
	104	26	ND	ND	>5,5 (7,21) [†]	3,9
	105	27	ND	ND	>5,5 (10,96) [†]	>5,5 (109,4) [†]
	106	28	ND	ND	>5,5 (7,37) [†]	>5,5 (40,7) [†]
	114	29	ND	ND	>5,5 (7,65) [†]	>5,5 (11,1) [†]
	118	30	0,8	ND	>5,5 (12,13) [†]	>5,5 (19,4) [†]

* Análise de TCA após engarrafamento; ** Análise de TCA em discos antes da colagem; ‡ Rolhas reagrupadas; † >5,5 - valor superior da gama de concentração usada na reta de calibração (...) resultado obtido por extrapolação relativamente à gama de concentração.

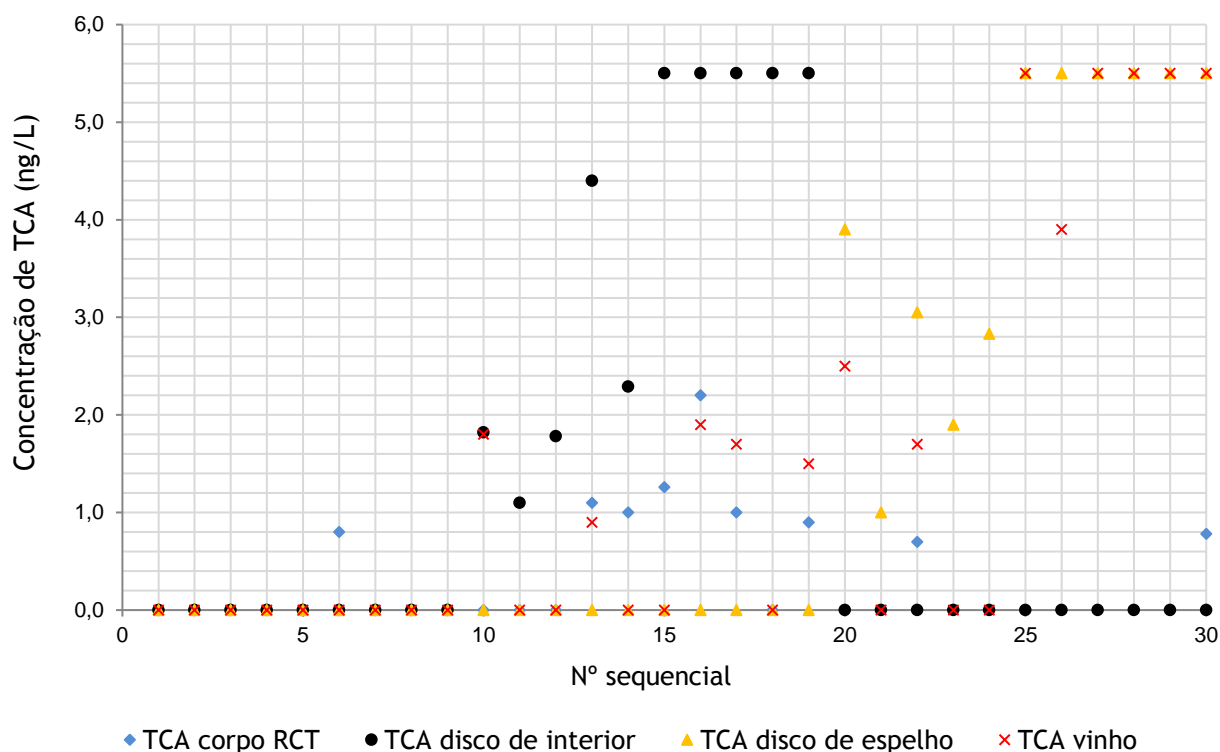


Figura 6 - Resultados de TCA nos corpos RCT, nos discos e nos vinhos correspondentes, aos 6 meses. Os valores de TCA superiores a 5,5 ng/L são considerados iguais a esse valor por se encontrarem fora da gama analítica da curva de calibração (de 0,5 a 5,5 ng/L).

Os resultados após 12 meses de engarrafamento encontram-se apresentados na Tabela 6 e na Figura 7. Nos grupos 1 e 2, os resultados de TCA de todos os vinhos foram ND, o que demonstra a inexistência de migração de TCA do corpo RCT para o vinho. No entanto, tal como aconteceu aos 6 meses, a incidência de TCA nos corpos RCT foi de cerca de 30 % e os valores medidos no corpo final foram bastante inferiores aos medidos em granulado. Dessa forma, os resultados obtidos permitem concluir que com os valores de TCA presentes nos corpos RCT não existiu qualquer contaminação dos vinhos, mas, no entanto, permanece a incerteza do que aconteceria com valores de TCA mais altos nos corpos RCT.

No grupo 3a existiram três vinhos contaminados com valores de TCA de 0,9, 1,8 e 2,8 ng/L, correspondentes às rolhas com discos de interior com 1,8, 2,2 e 3,4 ng/L, respetivamente. As restantes duas rolhas, apesar de também terem o disco de interior com valores positivos de TCA, não apresentaram esse composto aos 12 meses. Por outro lado, no grupo 3b todos os vinhos apresentaram valores de TCA positivos. Uma vez que aos 6 meses apenas 60 % dos vinhos desse grupo apresentaram TCA, verificou-se que a incidência de TCA nos vinhos neste grupo parece ser proporcional ao longo do tempo, já que ao fim de 12 meses essa incidência foi de 100 %. Este facto poderá estar relacionado com a maior migração de líquido ao longo da rolha (constatado pela análise visual aquando da extração), o que poderá levar a esta maior relação.

É expectável que o TCA presente nos vinhos destes grupos tenha migrado do disco de interior, uma vez que era o segmento da rolha que se encontrava contaminado em ambos. A contaminação desses vinhos foi mais significativa no grupo 3b, cujas rolhas apresentavam valores de TCA nos discos de interior com concentração superior a 5 ng/L.

Nos grupos 4a e 4b apenas um vinho (rolha 89 - grupo 4a) não apresentou contaminação de TCA e, por isso, a incidência de migração nestes dois grupos foi de 90 %. As rolhas 101 e 102, inicialmente identificadas como sendo do grupo 4a, apresentaram nos respetivos vinhos valores de TCA bastante superiores (na 101 de 7,4 ng/L e na 102 de 18,1 ng/L) aos dos discos de espelho (na 101 de 3,8 ng/L e na rolha 102 de 1,7 ng/L) e, por esse motivo, procedeu-se à repetição da análise destes últimos, para os quais se obtiveram valores de 8,4 e 18,6 ng/L nas rolhas 101 e 102, respetivamente. Uma vez que estes discos de espelho apresentaram valores de TCA superiores a 5 ng/L, essas rolhas foram reagrupadas no grupo 4b. O mesmo procedimento foi efetuado para as rolhas 109, 110, 112 e 121 sem ser, no entanto, necessário proceder a reagrupamento. No grupo 4b, em que as rolhas correspondentes tinham concentração de TCA superior a 5 ng/L nos discos de espelho, todos os vinhos apresentaram valores de TCA positivos. É expectável que o TCA presente nos vinhos destes grupos tenha migrado do disco de espelho, uma vez que era o segmento da rolha que se encontrava contaminado em ambos.

É então possível concluir que, aos 12 meses, se verificou existir migração de TCA para o vinho a partir dos discos positivos, quer dos discos de interior, quer dos discos de espelho. Destaca-se que no caso da migração dos discos de interior para o vinho existiu um aumento proporcional com o tempo de abertura de garrafas, uma vez que aos 6 meses 60 % dos vinhos apresentaram TCA e aos 12 meses essa incidência subiu para os 80 %. Essa constatação está relacionada com o facto de existir migração de vinho através da rolha que, por consequência, potencia a extração do TCA. Isso pôde ser comprovado pela análise visual, em que se verificou que as rolhas estavam bastante humedecidas, essencialmente na parte dos discos. É por isso expectável que a relação da migração de TCA nos dois discos da rolha com o tempo de armazenamento seja proporcional, conforme se verificou com as condições deste ensaio. No que diz respeito à migração de TCA para o vinho a partir dos corpos RCT, os resultados obtidos permitem concluir que aos 6 e 12 meses não existiu qualquer contaminação nos vinhos. No entanto, permanece a incerteza do que aconteceria com valores de TCA mais altos nos corpos RCT.

Tabela 6 - Valores de TCA das rolhas (corpos RCT e discos) e vinhos aos 12 meses.

Grupo	Rolha	N° sequencial	TCA corpo* (ng/L)	TCA interior** (ng/L)	TCA espelho** (ng/L)	TCA vinho* (ng/L)
1	7	1	0,7	ND	ND	ND
	9	2	ND	ND	ND	ND
	15	3	ND	ND	ND	ND
	19	4	ND	ND	ND	ND
2	30	5	0,7	ND	ND	ND
	32	6	0,9	ND	ND	ND
	34	7	ND	ND	ND	ND
	39	8	ND	ND	ND	ND
3a	44	9	1,6	1,8	ND	0,9
	46	10	1,7	2,2	ND	1,8
	47	11	ND	3,4	ND	2,8
	48	12	ND	1,0	ND	ND
	49	13	ND	1,7	ND	ND
3b	70	14	ND	>5,5 (7,3) [†]	ND	2,8
	72	15	0,9	>5,5 (6,3) [†]	ND	1,2
	73	16	1,2	>5,5 (5,8) [†]	ND	3,9
	76	17	0,9	>5,5 (9,1) [†]	ND	1,4
	77	18	0,9	>5,5 (6,9) [†]	ND	4,1
4a	89	19	ND	ND	1,4	ND
	90	20	ND	ND	4,9	3,7
	100	21	ND	ND	1,4	1,1
4b	101 [‡]	22	ND	ND	>5,5 (8,4) [†]	>5,5 (7,4) [†]
	102 [‡]	23	ND	ND	>5,5 (18,6) [†]	>5,5 (18,1) [†]
	107	24	ND	ND	>5,5 (8,2) [†]	>5,5 (35,0) [†]
	109	25	6,1	ND	>5,5 (452,4) [†]	>5,5 (285,5) [†]
	110	26	ND	ND	>5,5 (28,7) [†]	>5,5 (11,0) [†]
	112	27	ND	ND	>5,5 (32,2) [†]	>5,5 (38,6) [†]
	121	28	ND	ND	>5,5 (10,2) [†]	>5,5 (17,6) [†]

* Análise de TCA após engarrafamento; ** Análise de TCA em discos antes da colagem; ‡ Rolhas reagrupadas; † >5,5 - valor superior da gama de concentração usada na reta de calibração (...) resultado obtido por extrapolação relativamente à gama de concentração.

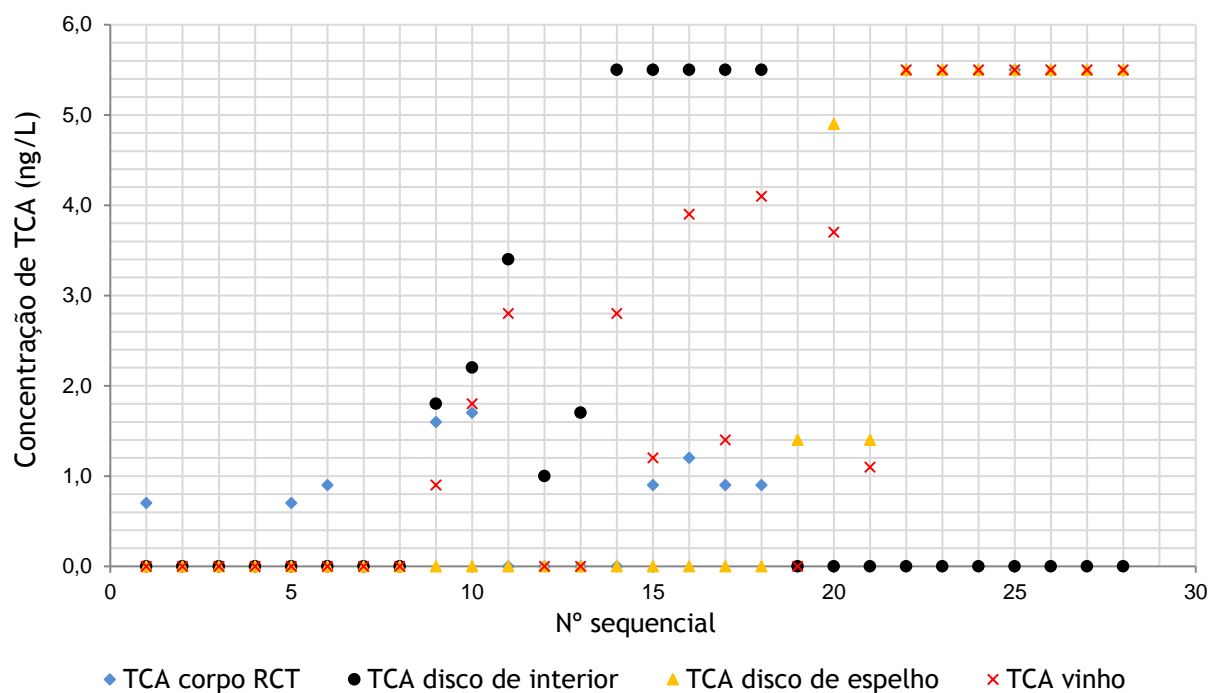


Figura 7 - Resultados de TCA nos corpos RCT, nos discos e nos vinhos correspondentes, aos 12 meses. Os valores de TCA superiores a 5,5 ng/L são considerados iguais a esse valor por se encontrarem fora da gama analítica da curva de calibração (de 0,5 a 5,5 ng/L).

4 Migração de *off-flavours* exógenos através da cortiça

Neste capítulo descreve-se a metodologia usada no estudo da migração de *off-flavours* exógenos através da cortiça, bem como os resultados obtidos. Este projeto foi iniciado pelo I&D em 2016, com duração prevista de 12 anos e com medições periódicas a cada 2 anos [30]. No período de estágio apenas se realizou o primeiro ponto de análise, 24 meses após o início do ensaio.

4.1 Metodologia

Numa fase inicial, encheram-se 167 garrafas com 370 ± 5 mL de solução hidroalcoólica (12 % etanol, v/v). Estas foram distribuídas por 6 barris utilizados na indústria cervejeira com vedação em borracha, sendo que cada um corresponde a um tempo de análise (Tabela A.2.1, Anexo 2). Para estas garrafas utilizaram-se quatro tipos de vedantes: rolha de cortiça natural 45 x 24 mm flor, rolha de champanhe de dois discos, Nomacorc classic + e cápsula de rosca (Saran). A distribuição das garrafas pelos barris encontra-se apresentada na Tabela A.2.1 (Anexo 2).

De seguida, colocaram-se as garrafas dispostas nos barris de forma homogénea, repartidas por fiada para evitar a influência da posição. De forma a contaminar a atmosfera dos barris, colocaram-se soluções de d₅-TCA e de TBA, ambas de concentração 20 µg/mL, em frascos de 60 mL abertos e dispostos nos barris na primeira fiada e em posições opostas, com a solução de d₅-TCA do lado esquerdo e a de TBA do lado direito, conforme se pode observar na Figura 8. A descrição da preparação das amostras de d₅-TCA e de TBA encontra-se apresentada no Anexo 2.



Figura 8 - Disposição dos frascos com os contaminantes e de algumas das garrafas no interior do barril (à esquerda) e válvula exterior e pressão do barril (à direita).

O primeiro ponto de análise foi realizado em março de 2018 com a abertura do barril correspondente aos 24 meses. Procedeu-se à abertura das 23 garrafas e pipetaram-se 10 mL de cada vinho para um *vial* de 20 mL com 3 g de NaCl, devidamente identificado. Este procedimento foi realizado em duplicado, uma vez que foram realizadas análises de d₅-TCA e de TBA. Para a análise de TBA, adicionaram-se 10 µL de padrão interno 2,3,6-TCA, enquanto que para a análise de d₅-TCA adicionaram-se 20 µL de padrão interno d₅-TBA. A avaliação do teor de d₅-TCA e de TBA foi realizada de acordo com o procedimento descrito no Anexo 1.

Após esse processo, procedeu-se à maceração dos vedantes em solução hidroalcoólica (12 % etanol, v/v). Para isso, as rolhas de champanhe foram cortadas em duas partes, cerca de 2 mm acima dos discos, e macerou-se a parte superior (corpo RCT) e inferior da rolha (discos de cortiça natural). As rolhas naturais foram cortadas em duas partes iguais e macerou-se a parte superior e inferior da rolha. As rolhas Nomacorc foram cortadas em duas partes iguais, sendo que a parte inferior foi depois cortada em várias partes, uma vez que esta é permeável e uma maior área exposta à solução traduz um valor mais real na extração e quantificação dos compostos. Relativamente à cápsula de rosca, o *liner* presente no interior foi retirado e macerado em separado da parte exterior. A Figura 9 mostra o processo de preparação dos vedantes, conforme descrito anteriormente. É de salientar que, de modo a evitar contaminações cruzadas, no final do corte de cada rolha a faca era lavada com solução hidroalcoólica (12 % etanol, v/v).



Figura 9 - Processo de preparação dos vedantes para posteriores macerações (em cima, à esquerda - rolha de champanhe de dois discos; em cima, à direita - rolha natural; em baixo, à esquerda - rolha sintética Nomacorc; em baixo, à direita - cápsula de rosca).

Após 24 h da maceração dos vedantes, procedeu-se à quantificação de d₅-TCA e de TBA pelo método de análise SPME-GC-ECD pelo que se pipetaram, em duplicado, 10 mL de cada macerado para um *vial* com 3 g de NaCl. Para a análise de TBA, adicionaram-se 10 µL de padrão interno 2,3,6-TCA, enquanto que para a análise de d₅-TCA adicionaram-se 20 µL de padrão interno d₅-TBA. A avaliação do teor de d₅-TCA e de TBA foi realizada de acordo com o procedimento descrito no Anexo 1.

Por fim, com o objetivo de estudar a migração de *off-flavours* exógenos através da rolha de champanhe de um disco, da rolha microgranulada e rolha aglomerada, encheram-se 20 garrafas de vidro comercial com 370 ± 5 mL de solução hidroalcoólica (12 % etanol, v/v). De seguida, colocaram-se as garrafas dispostas nos barris de forma homogênea, repartidas por fiada para evitar a influência da posição. As soluções de d₅-TCA e de TBA foram colocadas em frascos de 60 mL, dispostos no barril na primeira fiada e em posições opostas, com a solução de d₅-TCA do lado esquerdo e a de TBA do lado direito (conforme executado nos outros barris). A descrição da preparação das amostras de d₅-TCA e de TBA encontra-se apresentada no Anexo 2. A abertura do barril e a posterior análise dos resultados ficará a cargo do I&D, uma vez que o ensaio terá a duração de 2 anos, não estando, por isso, contemplados na presente dissertação os resultados destes vedantes.

4.2 Resultados e Discussão

Os resultados de TBA foram obtidos com o método de análise de cloroanisóis na gama de trabalho de 0,5 a 20,0 ng/L (Anexo 1). Apenas para ter uma ideia da ordem da grandeza, os resultados superiores a 20,0 ng/L foram obtidos por extrapolação.

No momento da abertura do barril, verificou-se que o frasco com TBA colocado no interior do barril se encontrava parcialmente entornado devido a uma incorreta deslocação do barril durante o período de 24 meses. O resultado da análise da solução contaminada com aquele composto (a que sobrou no frasco entornado) foi de 24,6 ng/L e, portanto, bastante abaixo da concentração inicial (20 µg/mL). No entanto, este é um valor meramente indicativo, já que os resultados superiores a 20,0 ng/L são obtidos por extrapolação. Assim, este resultado permite apenas verificar que, de facto, o barril se encontrava contaminado com TBA.

Os resultados representados na Figura 10 e na Tabela 7 demonstraram que não ocorreu migração daquele composto para o vinho em garrafas com qualquer um dos vedantes em estudo. No segmento superior (em contacto com a atmosfera contaminada) todos os vedantes apresentaram valores positivos de TBA. Relativamente ao segmento inferior, o vedante Nomatic foi o único que apresentou valores positivos de TBA. Estes resultados eram previsíveis, uma vez que o Nomatic é permeável a compostos voláteis, ao contrário da cápsula de rosca e da rolha de cortiça que são impermeáveis.

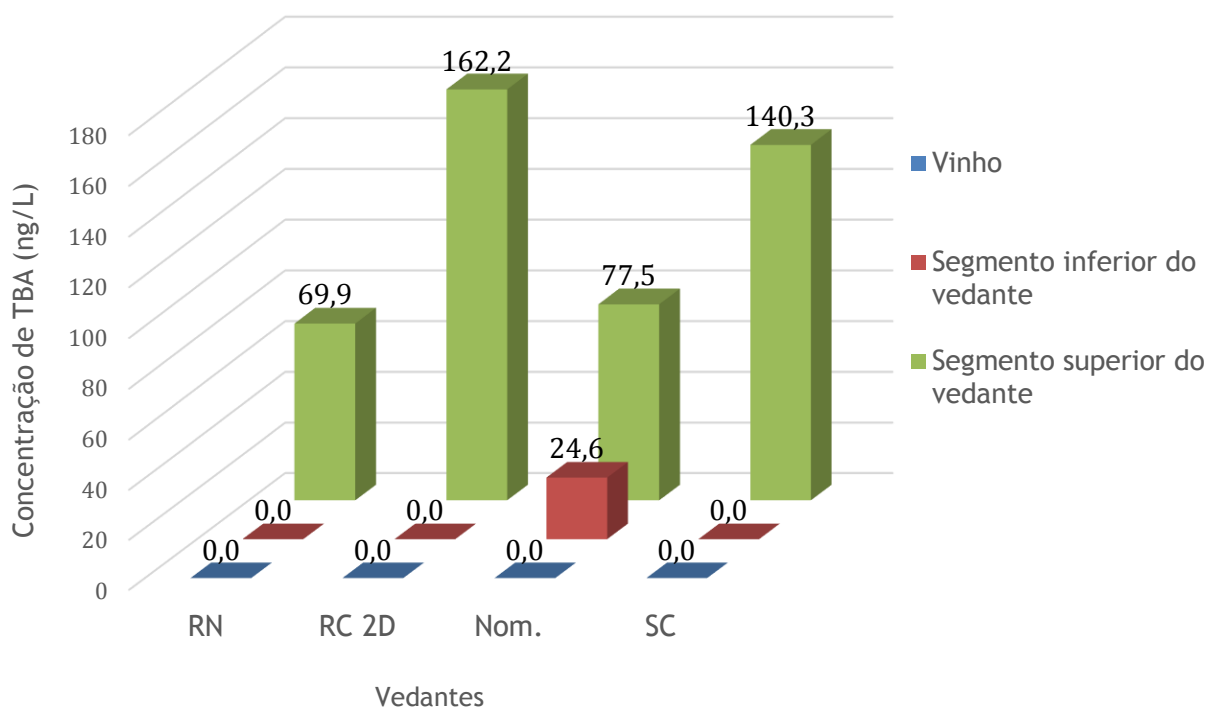


Figura 10 - Valores médios de concentração de TBA (ng/L) nos vinhos e nos segmentos inferior e superior dos vedantes (RN - rolha natural; RC 2D - rolha de champanhe de dois discos; Nom. - vedante sintético Nomacorc; SC - cápsula de rosca), aos 24 meses.

Os resultados de d₅-TCA foram obtidos com o método de análise de d₅-TCA na gama de trabalho de 0,5 a 20,0 ng/L e sempre que os resultados foram superiores a 20,0 ng/L reprocessou-se o resultado na gama de trabalho de 0,5 a 200,0 ng/L (Anexo 1). Apenas para ter uma ideia da ordem da grandeza, os resultados superiores a 200,0 ng/L foram obtidos por extrapolação.

O resultado da análise à solução de d₅-TCA colocada no frasco de 60 mL no interior do barril foi de 6466,8 ng/L. Apesar deste valor ser bastante inferior à concentração inicial (20 µg/mL), aquando da sua colocação no interior do barril, este é um valor meramente indicativo, já que os resultados superiores a 200,0 ng/L são obtidos por extrapolação. Assim, este resultado permite apenas verificar que, de facto, o barril se encontrava contaminado com d₅-TCA.

Os resultados apresentados na Figura 11 e na Tabela 7 demonstraram que ocorreu migração daquele composto para o vinho em todas as garrafas vedadas com Nomacorc e numa garrafa vedada com cápsula de rosca (173,6 ng/L). Dado ser reconhecido que a cápsula de rosca (Saran) é completamente hermética, é possível que a contaminação encontrada se deva a uma garrafa mal vedada (algo que pode acontecer durante a capsulagem), uma vez que se tratou de um caso isolado. Todos os vedantes apresentaram valores positivos de d₅-TCA no segmento superior, com os valores mais elevados na rolha de champanhe e os mais baixos na rolha natural.

Esta diferença pode dever-se à presença de cola no corpo aglomerado da rolha de champanhe, que poderá favorecer a adsorção de d_5 -TCA na superfície da rolha.

Relativamente ao segmento inferior dos vedantes, apenas a rolha natural não apresentou contaminação de d_5 -TCA (Tabela 7). Os valores positivos nos *liners* das cápsulas de rosca podem dever-se a uma entrada de d_5 -TCA entre a garrafa e a cápsula, contaminando a parte superior do *liner* que está em contacto com o alumínio. Estes resultados foram concordantes com os obtidos pela universidade de Geisenheim [29]. Quanto à rolha de champanhe, a contaminação (com valores muito mais baixos relativamente ao Nomaticorc e ao *liner* da cápsula de rosca) pode dever-se à migração do d_5 -TCA pelo gargalo até à superfície lateral da rolha, contaminando o segmento inferior que contempla cerca de 2 mm do aglomerado e os dois discos.

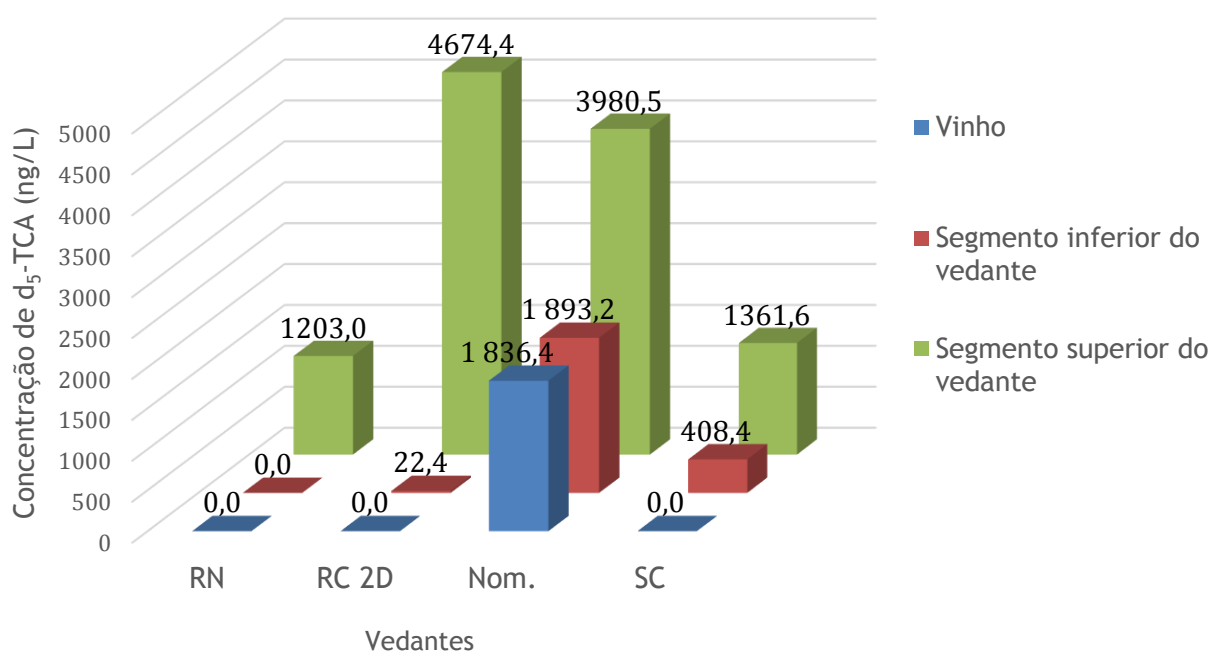


Figura 11 - Valores médios de concentração de d_5 -TCA (ng/L) nos vinhos e nos segmentos inferior e superior dos vedantes (RN - rolha natural; RC 2D - rolha de champanhe de dois discos; Nom. - vedante sintético Nomaticorc; SC - cápsula de rosca), aos 24 meses.

Tabela 7 - Concentração de TBA e d₅-TCA dos vinhos e dos vedantes (segmento superior e inferior) aos 24 meses.

Vedante	Nº sequencial	Vinho	TBA (ng/L)		Vinho	d ₅ -TCA (ng/L)	
			Segmento Superior (Vedante)	Segmento Inferior (Vedante)		Segmento Superior (Vedante)	Segmento Inferior (Vedante)
Rolha natural	1	ND	64,0	ND	ND	1107,8	ND
	2	ND	69,3	ND	ND	845,2	ND
	3	ND	66,2	ND	ND	1294,8	ND
	4	ND	75,9	ND	ND	1533,3	ND
	5	ND	71,2	ND	ND	1139,1	ND
	6	ND	69,5	ND	ND	1232,0	ND
	7	ND	61,0	ND	ND	887,2	ND
	8	ND	64,9	ND	ND	1891,6	ND
	9	ND	87,1	ND	ND	896,1	ND
Rolha de champanhe 2D	1	ND	87,3	ND	ND	4315,1	10,0
	2	ND	108,4	ND	ND	4252,3	15,8
	3	ND	89,1	ND	ND	4737,3	62,8
	4	ND	106,1	ND	ND	3773,8	14,8
	5	ND	96,4	ND	ND	5015,5	18,2
	6	ND	121,3	ND	ND	5340,3	14,8
	7	ND	170,0	ND	ND	5358,2	22,4
	8	ND	519,0	ND	ND	4602,4	20,5
Nomacorc	1*	ND	-	-	1594,6	-	-
	2	ND	88,0	32,2	2265,3	4309,8	1461,9
	3	ND	67,0	17,0	1649,3	3651,1	2324,4
Cápsula de rosca	1	ND	200,0	ND	ND	1160,9	364,3
	2	ND	100,0	ND	173,6	1515,0	512,0
	3	ND	121,0	ND	ND	1408,8	348,9

* Análise do vedante comprometida por impossibilidade de extração do mesmo da garrafa.

5 Impacto dos *off-flavours* no vinho espumante

Neste capítulo descreve-se a metodologia usada no estudo do impacto dos *off-flavours* no vinho espumante, bem como os resultados obtidos. Este projeto foi iniciado pelo I&D em 2016, com duração prevista de 24 meses e com medições periódicas aos 6, 12 e 24 meses [32]. Uma vez que o primeiro e segundo pontos de análise já tinham sido efetuados, no período de estágio apenas se realizou o terceiro (e último) ponto de análise, 24 meses após o início do ensaio.

5.1 Metodologia

Inicialmente foi feita uma seleção de 10 de lotes de rolhas de champanhe de 2 discos 48 x 30,5 mm ou 48 x 31 mm de diferentes classes de qualidade. Realizou-se uma análise sensorial a cerca de 5 000 rolhas por cada lote no *sniffing* industrial da CHK com um painel de 2 a 4 provadores e foi feita uma segregação de todas as rolhas com qualquer tipo de desvio sensorial. Estas foram classificadas em famílias de desvios: TCA, mofo, putrefação, químico, vegetal e cera/cola. A distribuição das amostragens dos diferentes lotes está apresentada na Tabela A.3.1 (Anexo 3).

Das rolhas aprovadas por cada lote (sensorialmente neutras), recolheram-se 100 para a realização de macerações individuais dos discos em água e fizeram-se análises sensoriais e análises do teor de TCA por SPME-GC-ECD.

Amostraram-se 30 rolhas por cada família de desvios mencionados anteriormente e 70 rolhas aprovadas (sensorialmente neutras que servirão como testemunha) e procedeu-se ao engarrafamento nas caves Vinhos Borges com espumante, em maio de 2016. As garrafas foram transportadas para a A&I e colocadas na posição horizontal. Após 6 dias de engarrafamento, realizou-se uma análise química ao vinho no laboratório da CVRVV (resultados apresentados na Tabela A.3.2 - Anexo 3).

Após 6, 12 e 24 meses de engarrafamento, foram realizadas análises sensoriais triangulares de cada um dos descritores sensoriais relativamente a rolhas testemunha. Nos tempos de análise de 6 e 24 meses, foram amostradas 5 garrafas vedadas com rolhas por cada desvio sensorial e 5 garrafas vedadas com rolhas sensorialmente neutras. No tempo de análise de 12 meses, foram amostradas 4 garrafas vedadas com rolhas por cada desvio sensorial e 4 garrafas vedadas com rolhas sensorialmente neutras. As análises foram realizadas na Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes (CVRVV) e o painel de prova foi composto por elementos da A&I e da CVRVV. Na análise sensorial triangular, são dispostos três copos por cada série. De acordo com a distribuição das garrafas pelos copos, pré-definida pelo responsável do ensaio, vertem-se cerca de 20 mL de vinho da mesma garrafa em dois dos copos e cerca de 20 mL de vinho de

outra garrafa no terceiro. Para cada série, o provador identifica, na folha de prova, o copo que acha que tem a amostra diferente, descreve a diferença encontrada e indica qual a sua preferência. No Anexo 3 encontra-se apresentada a folha de prova da análise sensorial triangular (Figura A.3.1) e uma tabela exemplo de distribuição das garrafas pelas diferentes séries de copos (Tabela A.3.3). Paralelamente, foram realizadas análises de TCA aos vinhos pelo método SPME-GC-MS.

5.2 Resultados e Discussão

Os resultados de TCA foram obtidos com o método de análise de cloroanisóis na gama de trabalho de 0,5 a 5,5 ng/L. Apenas para ter uma ideia da ordem da grandeza, os resultados superiores a 5,5 ng/L foram obtidos por extrapolação.

Na Tabela 8, Tabela 10 e Tabela 12, encontram-se apresentados os resultados das análises sensoriais triangulares aos 6, 12 e 24 meses, respetivamente. Nestas tabelas está apresentado, para cada descritor sensorial, o número de membros do painel de provadores, o número de respostas corretas e incorretas e, relativamente às respostas corretas, a percentagem de respostas em que o provador preferiu as amostras positivas (vinhos vedados com as rolhas com o respetivo descritor) ou as amostras negativas (vinhos vedados com as rolhas sensorialmente neutras). Para além disso, é também apresentado o número crítico, isto é, o número mínimo de respostas corretas para estabelecer diferenças significativas a um nível de significância de 5 %. No Anexo 3, encontra-se apresentada a Tabela A.3.4, utilizada para determinar o número crítico de cada análise, consoante o número de respostas total [33].

Após 6 meses de engarrafamento, os resultados das análises sensoriais triangulares, realizadas com 5 garrafas por cada descritor, demonstraram que apenas o descritor TCA apresentou diferenças significativas perante as amostras negativas (Tabela 8), já que o número de respostas corretas (23) foi superior ao número crítico (17) para níveis de significância de 5 %. Nas análises de TCA, o descritor TCA apresentou dois resultados positivos (10,8 e 17,0 ng/L), sendo que todos os outros resultados foram ND (Tabela 9).

Tabela 8 - Análises sensoriais triangulares aos 6 meses.

Descritor	Painel	Respostas corretas	Respostas incorretas	Número crítico	Diferenças significativas	Preferência (%)	
						Positivas	Negativas
Cera/Cola	7	14	21	17	Não	20	80
TCA	7	23	12	17	Sim	6	94
Mofo	7	14	21	17	Não	50	50
Químico	7	15	20	17	Não	46	54
Putrefação	7	14	21	17	Não	54	46
Vegetal	6	9	21	15	Não	50	50

Tabela 9 - Análises de TCA pelo método SPME-GC-MS aos vinhos a 6 meses.

Descritor	TCA (ng/L)	Descritor	TCA (ng/L)	Descritor	TCA (ng/L)	Descritor	TCA (ng/L)
Neutro	ND	TCA	10,8	Químico	ND	Vegetal	ND
	ND		17,0		ND		ND
	ND		ND		ND		ND
	ND		ND		ND		ND
	ND		ND		ND		ND
Cera/Cola	ND	Mofo	ND	Putrefação	ND		
	ND		ND		ND		
	ND		ND		ND		
	ND		ND		ND		
	ND		ND		ND		

Os resultados das análises sensoriais a 12 meses (Tabela 10), realizadas com 4 garrafas por cada descritor, demonstraram que os descritores TCA e vegetal apresentaram diferenças significativas perante as amostras negativas, já que o número de respostas corretas (16 e 14, respetivamente) foi superior ao número crítico (13) para níveis de significância de 5 %. Contudo, verificou-se que um dos vinhos vedados com o descritor vegetal apresentou 3,8 ng/L de TCA na análise pelo método SPME-GC-MS (Tabela 11), o que contribuiu com 6 das 14 respostas corretas

na análise sensorial. Desta forma, concluiu-se que as diferenças encontradas no descritor vegetal se deveram essencialmente a uma amostra que apresentava um valor elevado de TCA (3,8 ng/L). Destaca-se também que o descritor putrefação apresentou três amostras com TCA (1,3 ng/L, 0,7 ng/L e 0,6 ng/L) mas estas não foram assinaladas pelos provadores na análise sensorial. Os restantes descritores não apresentaram diferenças a assinalar.

Tabela 10 - Análises sensoriais triangulares aos 12 meses.

Descritor	Painel	Respostas corretas	Respostas incorretas	Número crítico	Diferenças significativas	Preferência (%)	
						Positivas	Negativas
Cera/Cola	6	11	13	13	Não	50	50
TCA	6	16	8	13	Sim	15	85
Mofo	6	10	14	13	Não	50	50
Químico	6	11	13	13	Não	56	44
Putrefação	6	12	12	13	Não	44	56
Vegetal	6	14	10	13	Sim	62	38

Tabela 11 - Análises de TCA pelo método SPME-GC-MS aos vinhos a 12 meses.

Descritor	TCA (ng/L)	Descritor	TCA (ng/L)	Descritor	TCA (ng/L)	Descritor	TCA (ng/L)
Neutro	ND	TCA	1,3	Químico	ND	Vegetal	3,8
	ND		52,8		ND		ND
	ND		ND		ND		ND
	ND		0,6		ND		ND
Cera/Cola	ND	Mofo	ND	Putrefação	1,3		
	ND		ND		0,7		
	ND		1,8		0,6		
	ND		ND		ND		

Os resultados das análises sensoriais triangulares a 24 meses (Tabela 12), realizadas com 5 garrafas por cada descritor, demonstraram que os descritores cera/cola e putrefação apresentaram diferenças significativas perante as amostras negativas, já que o número de respostas corretas (16 e 20, respetivamente) foi superior ao número crítico (15) para níveis de

significância de 5 %. No entanto, na análise de TCA, o descritor cera/cola apresentou uma amostra com TCA (1,5 ng/L), que contribui com 4 das 16 respostas corretas, e o descritor putrefação apresentou duas amostras com TCA (0,8 ng/L e 0,7 ng/L), que contribuíram com 11 das 20 respostas corretas (Tabela 13). Assim, as diferenças encontradas nestes dois descritores foram muito influenciadas pela existência de TCA nesses vinhos.

Tabela 12 - Análises sensoriais triangulares aos 24 meses.

Descritor	Painel	Respostas corretas	Respostas incorretas	Número crítico	Diferenças significativas	Preferência (%)	
						Positivas	Negativas
Cera/Cola*	6	16	14	15	Sim	44	50
TCA	6	13	17	15	Não	46	54
Mofo	6	10	20	15	Não	40	60
Químico*	6	10	20	15	Não	30	60
Putrefação	6	20	10	15	Sim	50	50
Vegetal*	6	13	17	15	Não	23	46

*Descritor com algumas respostas sem preferência.

Tabela 13 - Análises de TCA pelo método SPME-GC-MS aos vinhos a 24 meses.

Descritor	TCA (ng/L)	Descritor	TCA (ng/L)	Descritor	TCA (ng/L)	Descritor	TCA (ng/L)
Neutro	ND	TCA	ND	Químico	ND	Vegetal	ND
	ND		0,9		ND		ND
	ND		0,6		ND		ND
	ND		0,9		0,8		ND
	ND		ND		ND		ND
Cera/Cola	ND	Mofo	0,7	Putrefação	ND		
	ND		ND		ND		
	ND		ND		0,8		
	ND		ND		0,7		
	1,5		ND		ND		

Destaca-se, também, que aos 24 meses, nos descritores TCA, químico e mofo, existiram vinhos com valores de TCA, mas que dada a sua baixa concentração, os provadores não os

diferenciaram na análise sensorial. Assim se explica que nos pontos de análise precedentes se tenham verificado sempre diferenças significativas no TCA perante amostras negativas, o que não se verificou aos 24 meses.

Os resultados após 6, 12 e 24 meses, permitem concluir que o único *off-flavour* que apresentou diferenças robustas ao nível sensorial perante amostras neutras foi o TCA. Nos casos em que outros *off-flavours* foram percecionados nas análises sensoriais, como o caso do vegetal, da putrefação e da cera/cola, os vinhos estavam contaminados com TCA, verificando-se que este composto é um marcador bastante importante de desvios sensoriais em vinhos espumantes. Os outros desvios sensoriais para além do TCA, apesar de serem percecionados no *sniffing* e também em maceração com água (não testado neste trabalho, mas que é de conhecimento interno) parecem não ser percecionados em vinho, não provocando, por isso, efeitos significativos.

6 Conclusões

Estudou-se a migração de TCA na rolha de champanhe de dois discos, com diferentes distribuições de TCA nos corpos RCT e nos discos de espelho e de interior, ao longo de 12 meses. Nas rolhas com disco de interior positivo, verificou-se que existiu migração de TCA para o vinho, com uma incidência de 60 % e 80 %, ao fim de 6 e 12 meses, respetivamente. Nas rolhas com disco de espelho positivo, a ocorrência de contaminação dos vinhos foi superior, com valores de 73 % e 90 %, ao fim de 6 e 12 meses, respetivamente. Essa constatação está relacionada com o facto de existir migração de vinho através da rolha que, por consequência, potencia a extração do TCA. Isso pôde ser comprovado pela análise visual das rolhas, em que se verificou que estas estavam bastante humedecidas, essencialmente na parte dos discos. Através da avaliação dos resultados após 6 e 12 meses de ensaio, é expectável que a migração de TCA nos dois discos da rolha aumente proporcionalmente com o tempo de armazenamento. No que diz respeito à migração de TCA para o vinho a partir dos corpos RCT, os resultados obtidos permitem concluir que aos 12 meses não existiu qualquer contaminação nos vinhos. No entanto, permanece a incerteza do que aconteceria com valores de TCA mais altos nos corpos RCT, uma vez que os valores do RCT do granulado não corresponderam aos do RCT em rolha.

Foi também avaliada a migração de TBA e d₅-TCA presentes numa atmosfera contaminada para garrafas de vinho obturadas com rolhas de cortiça natural, rolhas de champanhe de dois discos, rolhas sintéticas Nomaticorc e cápsulas de rosca (Saran). Aos 24 meses, a rolha de cortiça natural, a rolha de champanhe de dois discos e a cápsula de rosca demonstraram ser bons vedantes na vedação ao TBA e ao d₅-TCA, uma vez que os vinhos não apresentaram estes contaminantes. Por outro lado, o vedante sintético Nomaticorc revelou-se permeável pois todos os vinhos apresentaram d₅-TCA. A migração de TBA neste vedante ocorrerá, certamente, com o tempo, uma vez que aos 24 meses o segmento inferior já se encontrava contaminado.

Foi avaliado o impacto dos *off-flavours* na evolução sensorial de um espumante, através do engarrafamento com rolhas com desvios sensoriais. Os resultados após 6, 12 e 24 meses, permitem concluir que o único *off-flavour* que apresentou diferenças robustas ao nível sensorial perante amostras neutras foi o TCA. Nos casos em que outros *off-flavours* foram percecionados nas análises sensoriais, como o caso do vegetal, da putrefação e da cera/cola, os vinhos estavam contaminados com TCA. Demonstrou-se, neste estudo, que o TCA é um marcador bastante importante de desvios sensoriais em vinhos e que os outros desvios sensoriais para além desse parecem não ser percecionados no vinho.

7 Avaliação do trabalho realizado

7.1 Objetivos Realizados

Dado que o período de realização da dissertação foi de seis meses, não foi possível executar todos os pontos de análise dos projetos integrados. Desta forma, no estudo da migração de TCA na rolha de champanhe de dois discos para os vinhos espumantes, realizou-se o ponto de análise de 12 meses, ficando em falta os próximos pontos de análise aos 24 e 48 meses. Relativamente ao estudo da migração de *off-flavours* exógenos através da cortiça, apenas o primeiro ponto de análise foi realizado (24 meses), ficando em falta os restantes pontos de análise de 2 em 2 anos, durante os próximos 10 anos. Quanto ao estudo do impacto dos *off-flavours* no vinho espumante, este ficou terminado com a análise do último tempo de análise, correspondente aos 24 meses.

7.2 Outros Trabalhos Realizados

Durante o período de estágio, foram realizadas inúmeras análises de TCA às amostras que, por rotina, chegam diariamente ao laboratório do I&D. Esta foi uma mais-valia para a aprendizagem, aquisição de conhecimentos e de experiência sobre o método de análise SPME-GC-ECD/MS, importante para a realização do presente projeto.

Em paralelo com o projeto desta dissertação, houve participação no estudo de novas tecnologias ou processos para reduzir o teor de pó libertado pela rolha de champanhe. Esta participação envolveu a pesquisa de tecnologias alternativas para possível implementação na fábrica da CHK, participação em reuniões com empresas detentoras dessas tecnologias, bem como a realização de ensaios de quantificação do teor de pó e parâmetros físico-mecânicos, ambos no laboratório da CHK (Anexo 5).

Para além disso, foi acompanhado um estudo que pretende avaliar a eficácia do processo SuperROSA® na rolha de champanhe de dois discos (Anexo 4). Para esse estudo, foi necessário produzir as rolhas com os discos pretendidos na fábrica da CHK e realizar análises de TCA pelo método SPME-GC-ECD/MS no laboratório do I&D.

Na fase final do período de estágio, foi acompanhado um novo projeto que pretende validar soluções de rolhas de champanhe sem migração de compostos fenólicos para um novo vinho espumante.

7.3 Limitações e Trabalho Futuro

A grande limitação encontrada centra-se no facto dos projetos terem sido planeados para longos períodos de duração, pelo que se torna impossível a conclusão dos mesmos durante o período de estágio. Apesar dos próximos resultados não serem contemplados nesta tese, a continuidade das análises será assegurada por parte da empresa.

Relativamente ao estudo da migração de TCA na rolha de champanhe de dois discos, as conclusões relativamente à migração deste composto proveniente dos corpos RCT foram comprometidas pelo facto de existir uma grande variabilidade nos valores de TCA em todos os grupos, sendo que a análise inicial de TCA aos dois lotes de aglomerados utilizados não é refletida nos valores de TCA dos corpos RCT individuais. Deste modo, será importante a realização de um trabalho futuro onde se garanta uma concentração de TCA nos corpos RCT com valores entre 2 e 10 ng/L, de modo a verificar se de facto existe migração de TCA dos corpos RCT para o vinho.

Quanto ao estudo da migração de *off-flavours* exógenos através da cortiça, o facto do frasco com o contaminante TBA, que se encontrava aberto dentro do barril do tempo de análise de 24 meses, estar parcialmente entornado, levou a resultados inesperados nas análises deste composto. Assim, é importante garantir que os restantes barris (dos tempos de análise futuros) não são deslocados de forma incorreta, evitando que os frascos com os compostos sejam entornados.

7.4 Apreciação Final

Na indústria corticeira, especialmente nas unidades de rolhas para vinhos, é crucial a compreensão dos mecanismos de contaminação dos vinhos com haloanisóis. O facto de se verificar a contaminação dos vinhos vedados com os vedantes sintéticos Nomatic Classic +, põe em causa a eficiência destes como vedantes e permite à indústria corticeira um argumento importante relativamente às vantagens dos seus produtos face aos produtos sintéticos. Por outro lado, a demonstração do efeito de barreira a estes compostos proporcionado pelas rolhas de cortiça natural e de champanhe de dois discos, fortalece a sua importância no mercado dos vedantes de vinhos.

Todo o trabalho realizado ao longo do estágio foi uma mais-valia para o desenvolvimento da autora, não só a nível pessoal, mas também a nível profissional, complementando a formação académica obtida ao longo dos últimos cinco anos.

Referências

- [1] Cabral, M., *ROSA System winning the war against TCA*, 2006. Disponível em: <http://www.apcor.pt/wp-content/uploads/2015/09/ROSA-Focus-Issue.pdf>. [Acedido em: 29-Mar-2018].
- [2] Corticeira Amorim, Website da empresa, 2016. Disponível em: <https://www.amorimcork.com/pt/corticeira-amorim/>. [Acedido em: 01-Mar-2018].
- [3] Amorim & Irmãos, *Manual de acolhimento*, edição Amorim & Irmãos, S.A., Santa Maria de Lamas, 2015.
- [4] Corticeira Amorim, *Matéria-prima e processo produtivo*. Disponível em: <https://www.amorimcork.com/pt/natural-cork/raw-material-and-production-process/>. [Acedido em: 06-Mar-2018].
- [5] APCOR, *Manual Técnico - Rolhas*, 2015. Disponível em: http://www.apcor.pt/wp-content/uploads/2016/01/ManualRolhas_PT_VF.pdf. [Acedido em: 05-Mar-2018].
- [6] APCOR, *Cork Yearbook 17/18*, edição APCOR, Santa Maria de Lamas, 2018.
- [7] Corticeira Amorim, *The Art of Cork*, 2009. Disponível em: https://www.amorim.com/xms/files/Documentacao/Brochura_Arte_Cortica_Small_EN.pdf. [Acedido em: 27-Mar-2018].
- [8] Lopes, F. e Pereira, H., *Definition of quality classes for champagne cork stoppers in the high quality range*, *Wood Science and Technology*, vol. 34, pp. 3-10, 2000.
- [9] APCOR, *Champagne and Sparkling Wine Cork Stoppers*. Disponível em: <https://www.apcor.pt/en/products/cork-stoppers/champagne-and-sparkling-wine-cork-stoppers/>. [Acedido em: 07-Mar-2018].
- [10] Corticeira Amorim, *Rolha Spark*, 2016. Disponível em: <https://www.amorimcork.com/pt/products/catalogue/spark/>. [Acedido em: 07-Mar-2018].
- [11] Fortes, M. A., Rosa, M. E. e Pereira, H., *A Cortiça.*, IST Press. Lisboa, 2004.
- [12] Coque, J., Pérez, E., Goswami, M., Martínez, R., Garcia, S., Rodríguez, M. e Martín, J., *Wine Contamination by Haloanisoles: Towards the development of biotechnological strategies to remove chloroanisoles from cork stoppers*, *Inbiotec*, pp. 1-12, 2006.
- [13] Simpson, R. F. e Sefton, M. A., *Origin and fate of 2,4,6-trichloroanisole in cork bark and wine corks*, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, v. 13, pp. 106-116, 2007.

- [14] Vasconcelos, B., *Migração de 2,4,6-TCA através de rolhas Neutrocork para um vinho e implementação do método de análise para MDMP*, Tese de Mestrado, Universidade Católica Portuguesa, Escola Superior de Biotecnologia, Porto, Portugal, 2012.
- [15] Artwine Consultoria de Vinhos, “Falhas” e defeitos mais comuns em vinhos. Disponível em: <http://www.artwine.com.br/artigos-e-reportagens/423/falhas-e-defeitos-mais-comuns-em-vinhos-um-guia>. [Acedido em: 22-Jun-2018].
- [16] Coque, J., Rodríguez, M., Goswami, M. e Martínez, R., *Causes and origins of wine contamination by haloanisoles (chloroanisoles and bromoanisoles)*, ASECOR. Espanha, 2006.
- [17] Oliveira, D., *Implementação de Dry Soak em Rolhas de Cortiça*, Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências, Porto, Portugal, 2016.
- [18] Cork Quality Council, *Performance of disks as a TCA barrier in technical corks*, 2010. Disponível em: <https://www.corkqc.com/products/cqc-study-of-disk-performance-in-preventing-tca-transfer-from-1-1-corks>. [Acedido em: 23-Mai-2018].
- [19] Cork Quality Council, *Análise média de TCA - Rolhas naturais recebidas*, 2017. Disponível em: <https://www.corkqc.com/collections/audit-results/products/incoming-natural-corks-average-tca-score>. [Acedido em: 20-Jun-2018].
- [20] Amorim & Irmãos, Plano de experiências: Validação do sistema de *sniffing* industrial da Champcork, edição Amorim & Irmãos, S.A., 2016.
- [21] Sefton, M. A. e Simpson, R. F., *Compounds causing cork taint and the factors affecting their transfer from natural cork closures to wine - a review*, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, n. 11, pp. 226-240, 2005.
- [22] Machado, J. P., A3 - Super Rosa Champanhe, edição Amorim & Irmãos, S.A., 2017.
- [23] Capone, D., Skouroumounis, G., Barker, D., McLean, H., Pollnitz, A. e Sefton, M., *Absorption of chloroanisoles from wine by corks and by other materials*, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, vol. 5, pp. 91-98, 1999.
- [24] Chatonnet, P., Bonnet, S., Boutou, S. e Labadie, M., *Identification and responsibility of 2,4,6-tribromoanisoles in musty, corked odors in wine*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, pp. 1255-1262, 2004.
- [25] Lopes, T., *Estudos de migração do 2,4,6-tricloroanisol através de vedantes*, Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2008.
- [26] Lino, J., *Migração de d5-TCA através de vedantes em vinho e método para envelhecimento acelerado de um vinho*, Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia da

- Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2008.
- [27] Capone, D., Skouroumounis, G. e Sefton, M., *Permeation of 2,4,6- trichloroanisole through cork closures in wine bottles*, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, vol. 8, pp. 196-199, 2002.
- [28] Lopes, P., Marques, J., Lopes, T., Lino, J., Coelho, J., Alves, C., Roseira, I., Mendes, A. e Cabral, M., *Permeation of d5-2,4,6-Trichloroanisole via Vapor Phase through Different Closures into Wine Bottles*, *American Society for Enology and Viticulture*, vol. 62, n. 2, pp. 245-249, 2011.
- [29] University Hochschule Geisenheim, *Barrier properties of wine closures against airborne TCA*, 2017.
- [30] Amorim & Irmãos, Plano de experiências: Migração de oxigénio e *off-flavours* através da cortiça, 2016.
- [31] Amorim & Irmãos, Plano de experiências: Migração de TCA em rolhas de champanhe, 2017.
- [32] Amorim & Irmãos, Plano de experiências: Impacto dos descritores sensoriais do estudo da validação do *sniffing* em vinho espumante, 2017.
- [33] Oliveira, A., *Análise sensorial dos alimentos*, Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Curso de Tecnologia em Alimentos, 2010.
- [34] Departamento de Investigação e Desenvolvimento (I&D), Registo interno do laboratório do I&D - Exemplo de integração dos picos cromatográficos, 2017.
- [35] CTCOR, *Definição das principais áreas de inovação sectoriais - Cortiça*, 2010. Disponível em: http://www.produtech.org/documentos/estrategia/definicao-das-principais-areas-de-inovacao-no-sector-da-cortica-1/at_download/file. [Acedido em: 02-Mai-2018].
- [36] Hildebrand Technology, *Know-How of surface cleaning / dust removal*. Disponível em: https://www.hildebrand-technology.com/en/know_how/dust_removal/. [Acedido em: 02-Mai-2018].

Anexo 1 Método de análise SPME-GC-ECD/MS

Os ensaios de quantificação dos compostos em estudo foram realizados através do método de análise de microextração em fase sólida (SPME) conjugada com o método de cromatografia gasosa (GC) com detetor por captura de elétrons (ECD) ou por espectrometria de massa (MS). A técnica SPME consiste na retenção dos analitos de interesse numa fase estacionária constituída por um dispositivo de sílica fundida, em que uma das extremidades está recoberta por um filme polimérico fino. Após pré-incubação de 2 min, essa fibra é exposta à fase gasosa presente no espaço livre do tubo de cromatografia que contém a amostra, designado por *headspace*, durante 8 minutos, a 50 °C e com agitação. Os voláteis são termicamente desorvidos da fibra para o injetor do cromatógrafo, a 270 °C, onde esta permanece durante 4 min sob fluxo do gás de arrasto.

A adição de um padrão interno na amostra serve como referência relativamente ao tempo de retenção (detetores ECD e MS), bem como o espectro de massa no caso do detetor MS, confirmando assim a atribuição desse pico ao padrão interno usado. Através da relação das áreas dos picos de analito e de padrão interno, este último de concentração conhecida, é possível quantificar o TCA na amostra. A Figura A.1.1 apresenta um exemplo da integração dos picos do analito e do padrão interno.

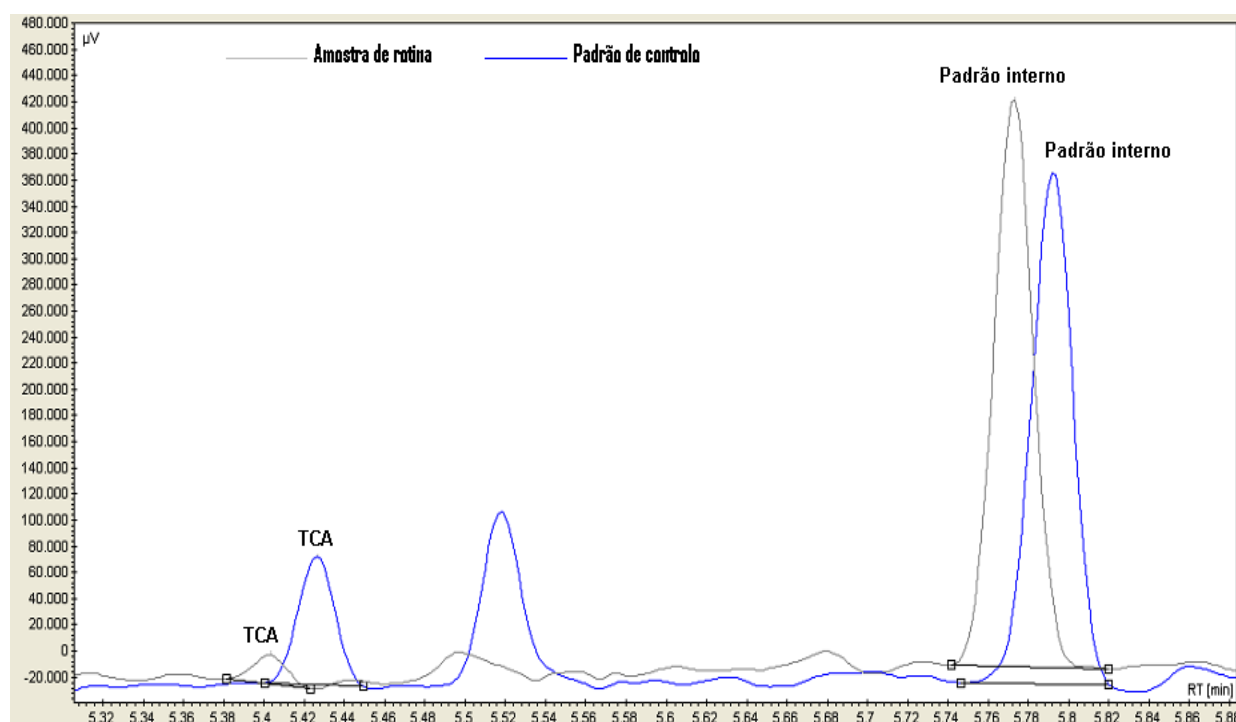


Figura A.1.1 - Exemplo de integração dos picos do analito (2,4,6-TCA) e do padrão interno (2,3,6-TCA) [34].

Nas análises de TCA, o padrão interno utilizado no MS foi o d₅-TCA, uma vez que este não pode ter a mesma massa molecular que o TCA (composto que se quer quantificar). O d₅-TCA difere do TCA na medida em que os hidrogénios são substituídos pelo deutério, apresentando maior massa molecular e um maior tempo de retenção. No caso do ECD, o padrão interno utilizado foi o 2,3,6-TCA que apresenta um menor tempo de retenção comparativamente ao 2,4,6-TCA.

Preparação das soluções de TCA:

- Pesar 10 mg de 2,4,6-TCA numa balança com precisão de 0,0001 g e dissolver num balão volumétrico de 100 mL com etanol a 96 % (v/v). Concentração obtida de 100 mg/L (solução 1);
- Pipetar 100 µL da solução 1 e diluir num balão volumétrico de 100 mL com etanol a 96 % (v/v). Concentração obtida de 100 µg/L (solução 2);
- Pipetar 10 mL da solução 2 e diluir num balão volumétrico de 100 mL com etanol a 96 % (v/v). Concentração obtida de 10 µg/L (solução 3);
- Pipetar 10 mL da solução 3 e diluir num balão volumétrico de 100 mL com etanol a 96 % (v/v). Concentração obtida de 1 µg/L (solução 4);
- Pipetar 10 mL da solução 4 e diluir num balão volumétrico de 100 mL com etanol a 96 % (v/v). Concentração obtida de 100 ng/L (solução 5).

Preparação das soluções de padrões internos:

- Pesar 10 mg do padrão (2,3,6-TCA para GC-ECD e d₅-TCA para GC-MS numa balança com precisão de 0,0001 g e dissolver num balão volumétrico de 100 mL com etanol a 96 % (v/v). Concentração obtida de 100 mg/L (solução 1);
- Pipetar 100 µL da solução 1 e diluir num balão volumétrico de 100 mL com etanol a 96 % (v/v). Concentração obtida de 100 µg/L (solução 2);
- Pipetar 2 mL da solução 2 e diluir num balão volumétrico de 100 mL com etanol a 96 % (v/v). Concentração obtida de 2 µg/L (solução 3).

Preparação das retas de calibração:

A quantificação dos compostos baseia-se na relação entre as áreas dos picos do analito e do padrão interno, utilizando, para isso, as curvas de calibração previamente traçadas, nas gamas de concentração de interesse.

Para a quantificação de TCA, foi feita uma reta de calibração para uma gama de concentração entre 0,5 e 5,5 ng/L (Figura A.1.2). A título de exemplo, a Tabela A.1.1 apresenta os volumes utilizados para a preparação dessa reta de calibração.

Tabela A.1.1 - Preparação da reta de calibração para a gama de análise de 0,5 a 5,5, ng/L.

Concentração teórica do padrão (ng/L)	Volume de solução etanólica a 12 % (mL)	Volume pipetado da solução 4 de 2,4,6-TCA (μL)	Volume pipetado da solução 5 de 2,4,6-TCA (μL)	Volume pipetado da solução 3 de padrão interno (μL)	Concentração real do padrão (ng/L)
0,5	10	-	50	100	0,498
1,5		-	150		1,478
2,5		25	-		2,494
3,5		35	-		3,488
4,5		45	-		4,480
5,5		55	-		5,470

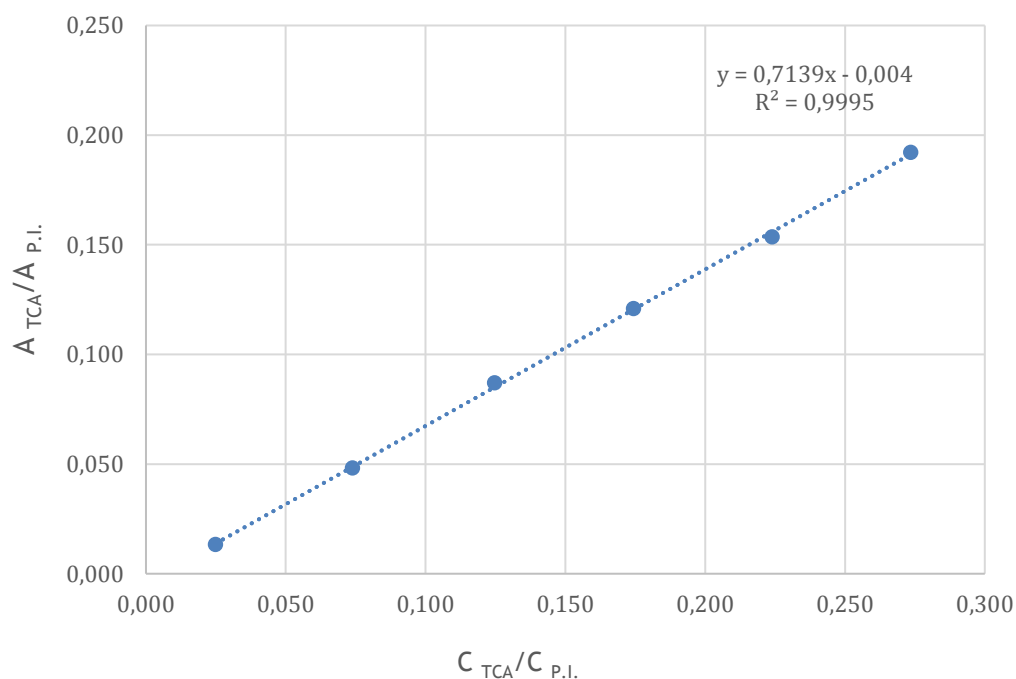


Figura A.1.2 - Reta de calibração para quantificação de TCA na gama de concentração de 0,5 a 5,5 ng/L.

Para a quantificação de d_5 -TCA, foram feitas duas curvas de calibração, uma na gama de concentração de 0,5 a 20,0 ng/L, e outra na gama de concentração de 0,5 a 200 ng/L. O padrão interno utilizado, neste caso, foi o d_5 -TBA. Os resultados de d_5 -TCA foram obtidos com o método de análise de d_5 -TCA na gama de trabalho de 0,5 a 20, 0 ng/L (Figura A.1.3) e sempre que os resultados foram superiores a 20,0 ng/L reprocessou-se o resultado na gama de trabalho de 0,5

a 200,0 ng/L (Figura A.1.4). Apenas para ter uma ideia da ordem da grandeza, os resultados superiores a 200,0 ng/L foram obtidos por extrapolação.

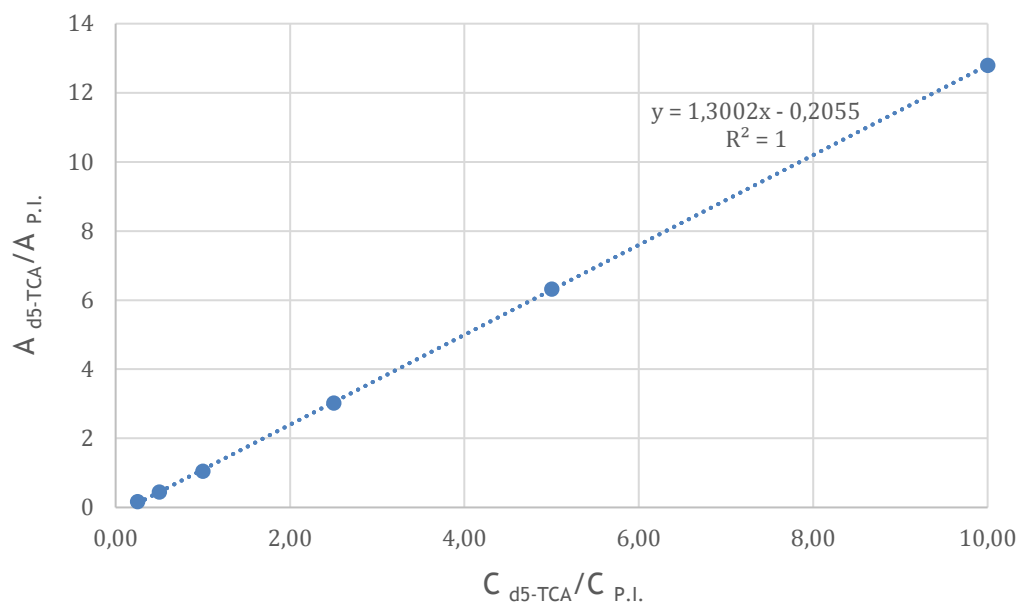


Figura A.1.3 - Reta de calibração para quantificação de d_5 -TCA na gama de concentração de 0,5 a 20,0 ng/L.

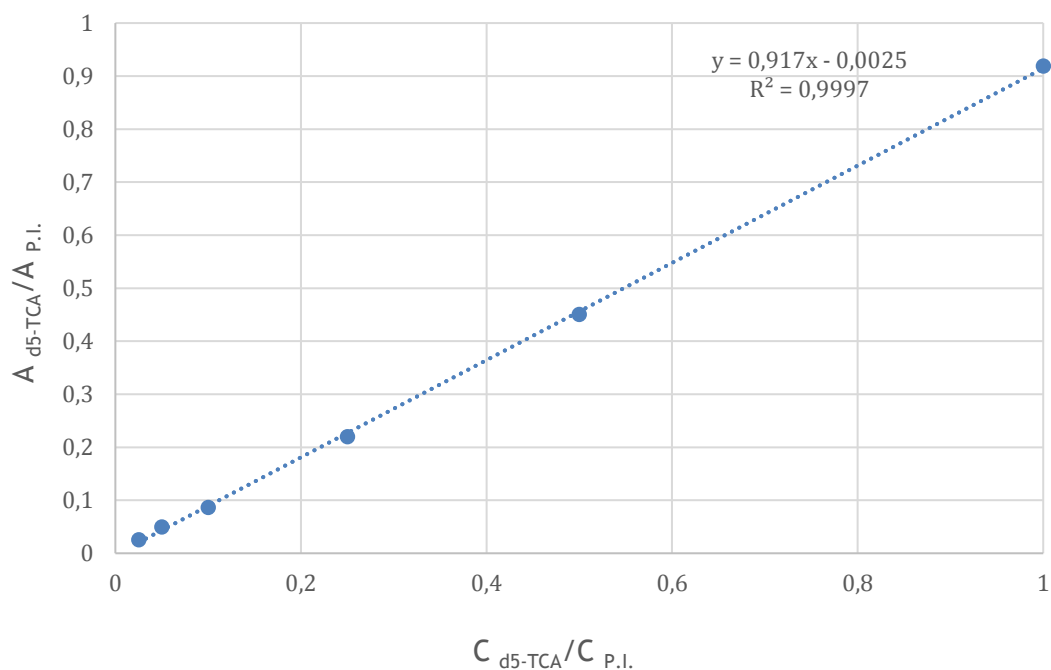


Figura A.1.4 - Reta de calibração para quantificação de d_5 -TCA na gama de concentração de 0,5 a 200,0 ng/L.

Para a quantificação de TBA, foi feita uma curva de calibração na gama de concentração de 0,5 a 20,0 ng/L (Figura A.1.5). O padrão interno utilizado, neste caso, foi o 2,3,6-TCA.

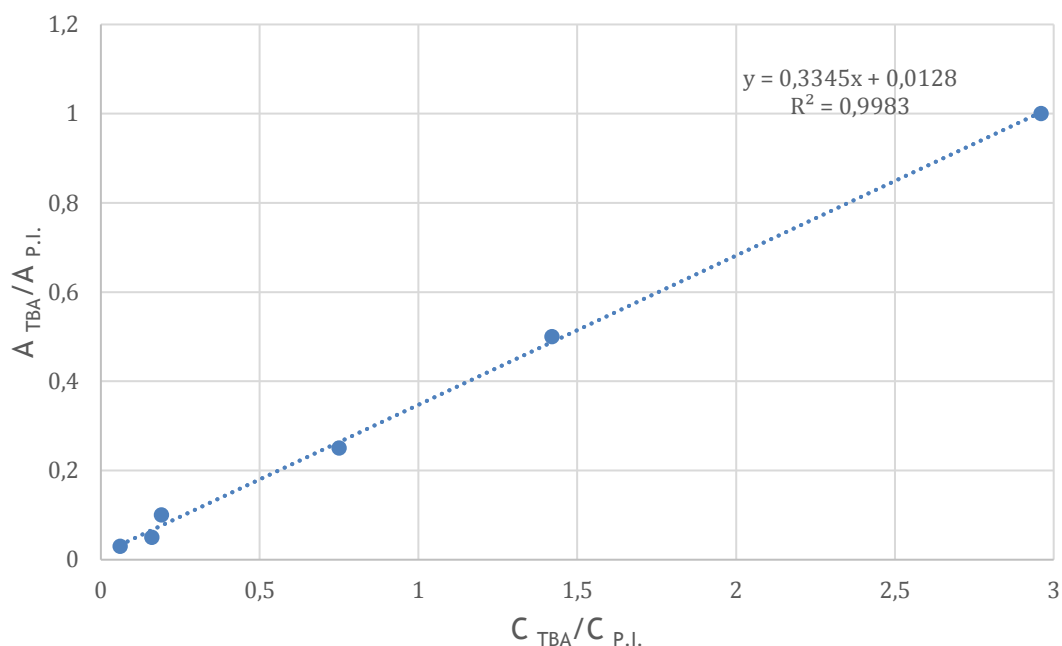


Figura A.1.5 - Reta de calibração para quantificação de TBA na gama de concentração de 0,5 a 20,0 ng/L.

Análise aos vedantes:

➤ Preparação da maceração:

- Preparar a solução hidroalcoólica (etanol, 12 % v/v): adicionar, através de uma proveta, 250 mL de etanol a 96 % (v/v) num balão volumétrico de 2 L e perfazer o volume do mesmo com água destilada.
- Colocar a rolha (ou um segmento da mesma) num frasco de vidro de 60 mL e completar o volume com a solução hidroalcoólica previamente preparada. Cobrir o frasco com papel de alumínio e fechar com a tampa de plástico. Deixar repousar durante 24 h à temperatura ambiente.

➤ Preparação das amostras para análise por SPME-GC-ECD/MS:

- Pipetar 10 mL da solução de maceração para um *vial* de 20 mL contendo aproximadamente 3 g de NaCl, o suficiente para saturar o líquido.
- Adicionar 100 µL de padrão interno e fechar o *vial* com a tampa de rosca.

Análise aos vinhos:

➤ Preparação das amostras para análise por SPME-GC-ECD/MS:

- Pipetar 10 mL do vinho para um *vial* de 20 mL contendo aproximadamente 3 g de NaCl, o suficiente para saturar o líquido.
- Adicionar 100 µL de padrão interno e fechar o *vial* com a tampa de rosca.

Anexo 2 Migração de *off-flavours* exógenos através da cortiça

Uma vez que o projeto “migração de *off-flavours* exógenos através da cortiça” tem uma duração prevista de 12 anos, com tempos de análise a cada 2 anos, foi necessário preparar um total de 6 barris. A distribuição das garrafas com os diferentes vedantes em estudo por cada barril encontra-se apresentada na Tabela A.2.1.

Tabela A.2.1 - Distribuição das garrafas com os diferentes vedantes pelos barris.

Vedante	24 meses	48 meses	72 meses	96 meses	120 meses	144 meses	Total
	Barril 1*	Barril 2*	Barril 3*	Barril 4*	Barril 5**	Barril 6**	
Rolha Natural	9	9	9	9	10	10	56
Champanhe de 2 discos	8	9	9	9	11	10	56
Nomacorc classic +	3	3	3	3	7	8	27
Cápsula de rosca	3	3	3	3	8	8	28
Total	23	24	24	24	36	36	167

*Volume dos barris: 30 L

**Volume dos barris: 50 L

Preparação das soluções de d₅-TCA e de TBA:

A balança utilizada para as pesagens de d₅-TCA e de TBA tem uma precisão de 0,0001 g. Assim, apesar de ter sido delineado utilizar em valor absoluto 100 µg dos compostos acima referidos, foram utilizadas quantidades superiores, visto ser impossível pesar massas tão baixas. As soluções foram preparadas com etanol a 96 % (v/v). Os valores de massa de d₅-TCA e de TBA por barril encontram-se na Tabela A.2.2. A concentração de ambas as soluções foi de 20 µg/mL.

Tabela A.2.2 - Massas de d₅-TCA e de TBA por barril.

Barril	Massa TCA (µg)	Massa TBA (µg)
1	1000	500
2	700	800
3	500	600
4	500	500
5	900	900
6	700	1000

Para a preparação das soluções contaminantes de concentração 20 µg/mL (c_f), colocadas no barril onde foram inseridas as garrafas com rolha de champanhe de um disco, rolha microgranulada e rolha com aglomerado RCT, utilizaram-se soluções existentes no laboratório de d₅-TCA e de TBA, de concentrações 160 000 µg/mL e 155 000 µg/mL, respetivamente. Prepararam-se 250 mL de cada solução, de acordo com a seguinte forma:

- Para um balão volumétrico de 250 mL (v_f), pipetaram-se 31 µL (v_i) da solução de d₅-TCA de concentração 160 000 µg/mL (c_i) e completou-se o volume com etanol a 96 % (v/v).

$$c_i \times v_i = c_f \times v_f \Leftrightarrow$$

$$160\,000 \times v_i = 20 \times 250 \Leftrightarrow$$

$$v_i = 31\,\mu\text{L}$$

- Para um balão volumétrico de 250 mL (v_f), pipetaram-se 32 µL (v_i) da solução de TBA de concentração 155 000 µg/mL (c_i) e completou-se o volume com etanol a 96 % (v/v).

$$c_i \times v_i = c_f \times v_f \Leftrightarrow$$

$$155\,000 \times v_i = 20 \times 250 \Leftrightarrow$$

$$v_i = 32\,\mu\text{L}$$

Anexo 3 Impacto dos *off-flavours* no vinho

Para a realização do projeto “impacto dos *off-flavours* no vinho”, realizou-se uma amostragem de rolhas de diferentes lotes. A Tabela A.3.1 apresenta, por cada amostragem no *sniffing*, o número de rolhas analisadas, o calibre e classe da rolha a que corresponde cada amostragem (classificada de A a F, sendo que A é a classe de melhor qualidade), o número e a percentagem de rolhas com desvios sensoriais.

Tabela A.3.1 - Amostragens de sniffing de diferentes lotes de rolhas 2D.

Amostragem	Calibre Classe	Nº de rolhas	Nº de rolhas segregadas	Rolhas com desvios sensoriais (%)
16/12/2015	48 x 30,5 mm E	2500	24	1,0
22/01/2016	48 x 30,5 mm F	5000	116	2,3
15/02/2016	48 x 30,5 mm F	5000	153	3,1
16/02/2016	48 x 30,5 mm E	5000	151	3,0
17/02/2016	48 x 30,5 mm E	5000	199	4,0
24/02/2016	48 x 30,5 mm C	5000	165	3,3
11/03/2016	48 x 30,5 mm B	4700	92	2,0
16/03/2016	48 x 31 mm A	5000	64	1,3
17/03/2016	48 x 31 mm A	5000	124	2,5
24/03/2016	48 x 31 mm A	5000	70	1,4
Total		47200	1158	2,5

Após 6 dias do engarrafamento, foi feita uma análise química ao vinho no laboratório da CVRVV. Os resultados de cada parâmetro analisado, bem como o método utilizado, encontram-se apresentados na Tabela A.3.2.

Tabela A.3.2 - Análise química ao vinho realizada no laboratório da CVRVV, 6 dias após engarrafamento.

Parâmetro	Método	Resultado
TAV (% v/v)	OIV-AS312-01A:2016	11,6
Massa volúmica (g/cm ³)	OIV-AS-2-01A:2012	1,00430 ± 0,0002
Açúcares totais (g/dm ³)	MI 142, ed.04 (Glucose+Frutose+Sacarose)	36,6 ± 2,8
Acidez total (g/dm ³)	OIV-AS313-01:2015	4,54
Acidez volátil (g/dm ³)	MI 074, ed.06	0,37 ± 0,06
pH	MI 073, ed.03	3,25
SO ₂ livre (mg/dm ³)	MI 011, ed.06	38
SO ₂ total (mg/dm ³)	MI 013, ed.06	118
DO a 420 nm	OIV-AS2-07	0,111

Na análise sensorial triangular, são dispostos três copos por cada série. De acordo com a distribuição das garrafas pelos copos, pré-definida pelo responsável do ensaio, vertem-se cerca de 20 mL de vinho da mesma garrafa em cada um de dois dos copos e cerca de 20 mL de vinho de outra garrafa no terceiro. A Tabela A.3.3 apresenta um exemplo de distribuição das garrafas pelas diferentes séries de copos numa análise sensorial triangular, onde se pretendia identificar o descritor putrefação. Para cada série, o provador identifica, na folha de prova (Figura A.3.1), o copo que acha que tem a amostra diferente, descreve a diferença encontrada e indica, se possível, qual a preferência.

Tabela A.3.3 - Exemplo de distribuição das garrafas pelas diferentes séries de copos numa análise sensorial triangular.

Série	Copo	Garrafa
1	1	Putrefação 1
	2	Putrefação 1
	3	Testemunha 1
2	4	Testemunha 2
	5	Testemunha 2
	6	Putrefação 2
3	7	Putrefação 3
	8	Putrefação 3
	9	Testemunha 3
4	10	Testemunha 4
	11	Testemunha 4
	12	Putrefação 4
5	13	Putrefação 5
	14	Testemunha 5
	15	Putrefação 5

Provador: _____

Data: ____/____/____

Série 1

Tem três amostras numeradas, das quais duas são idênticas e a terceira é diferente. Assinale a amostra que considera diferente.

1

2

3

Descreva a diferença encontrada: _____

Qual a amostra preferida? _____

Série 2

Tem três amostras numeradas, das quais duas são idênticas e a terceira é diferente. Assinale a amostra que considera diferente.

4

5

6

Descreva a diferença encontrada: _____

Qual a amostra preferida? _____

Série 3

Tem três amostras numeradas, das quais duas são idênticas e a terceira é diferente. Assinale a amostra que considera diferente.

7

8

9

Descreva a diferença encontrada: _____

Qual a amostra preferida? _____

Série 4

Tem três amostras numeradas, das quais duas são idênticas e a terceira é diferente. Assinale a amostra que considera diferente.

10

11

12

Descreva a diferença encontrada: _____

Qual a amostra preferida? _____

Série 5

Tem três amostras numeradas, das quais duas são idênticas e a terceira é diferente. Assinale a amostra que considera diferente.

13

14

15

Descreva a diferença encontrada: _____

Qual a amostra preferida? _____

Figura A.3.1 - Exemplo de uma folha de prova de análise sensorial triangular.

A Tabela A.3.4 foi utilizada para determinar o número crítico na análise dos dados das provas sensoriais triangulares [33].

Tabela A.3.4 - Número mínimo de respostas corretas para estabelecer diferença significativa entre as amostras, em vários níveis de significância (se o número de respostas corretas for maior ou igual ao número tabelado, existe diferença significativa entre as amostras, ao nível de significância observado) [33].

Número de respostas	Níveis de significância						
	5%	4%	3%	2%	1%	0,5%	0,1%
5	4	5	5	5	5	5	5
6	5	5	5	5	6	6	6
7	5	6	6	6	6	7	7
8	6	6	6	6	7	7	8
9	6	7	7	7	7	8	8
10	7	7	7	7	8	8	9
11	7	7	8	8	8	9	10
12	8	8	8	8	9	9	10
13	8	8	9	9	9	10	11
14	9	9	9	9	10	10	11
15	9	9	10	10	10	11	12
16	9	10	10	10	11	11	12
17	10	10	10	11	11	12	13
18	10	11	11	11	12	12	13
19	11	11	11	12	12	13	14
20	11	11	12	12	13	13	14
21	12	12	12	13	13	14	15
22	12	12	13	13	14	14	15
23	12	13	13	13	14	15	16
24	13	13	13	14	15	15	16
25	13	14	14	14	15	16	17
26	14	14	14	15	15	16	17
27	14	14	15	15	16	17	18
28	15	15	15	16	16	17	18
29	15	15	16	16	17	17	19
30	15	16	16	16	17	18	19
31	16	16	16	17	18	18	20
32	16	16	17	17	18	19	20
33	17	17	17	18	18	19	21
34	17	17	18	18	19	20	21
35	17	18	18	19	19	20	22
36	18	18	18	19	20	20	22
37	18	18	19	19	20	21	22
38	19	19	19	20	21	21	23
39	19	19	20	20	21	22	23
40	19	20	20	21	21	22	24
41	20	20	20	21	22	23	24
42	20	20	21	21	22	23	25
43	20	21	21	22	23	24	25
44	21	21	22	22	23	24	26
45	21	22	22	23	24	24	26
46	22	22	22	23	24	25	27
47	22	22	23	23	24	25	27
48	22	23	23	24	25	26	27
49	23	23	24	24	25	26	28
50	23	24	24	25	26	26	28
60	27	27	28	29	30	31	33
70	31	31	32	33	34	35	37
80	35	35	36	36	38	39	41
90	38	39	40	40	42	43	45
100	42	43	43	44	45	47	49

Anexo 4 Avaliação da eficácia do SuperROSA® na rolha de champanhe de dois discos

De modo a avaliar a eficácia do SuperROSA® na rolha de champanhe de dois discos, numeraram-se 225 discos de 34 mm e procedeu-se à análise de TCA por SPME-GC-ECD. Esses discos foram submetidos ao processo SR e, após esse processo, realizaram-se novamente análises de TCA, tendo-se observado uma redução média deste composto de 84 %.

Verificou-se que após o SR, dos 225 discos, 60 % apresentaram uma concentração de TCA não detetável (ND), isto é, inferior a 0,5 ng/L. Esta redução foi mais significativa nos discos com concentrações iniciais de TCA entre 0,5 ng/L e 5,0 ng/L, já que 82 % desses discos atingiram valores de TCA inferiores a 0,5 ng/L. Por outro lado, apenas 14 % dos discos com concentrações iniciais de TCA superiores a 15,0 ng/L e 43 % dos discos com concentrações iniciais de TCA entre 5,0 ng/L e 15,0 ng/L passaram a ND.

Após o SR, amostraram-se discos com TCA não detetável, discos com concentração de TCA entre 0,5 e 5,0 ng/L, discos com concentração de TCA entre 5,0 e 15,0 ng/L e discos com concentração de TCA superior a 15,0 ng/L. Utilizaram-se esses discos como discos de espelho na produção de 46 rolhas de champanhe de dois discos de calibre 48 x 30,5 mm.

Inicialmente, os discos apresentavam um diâmetro de 34 mm, pelo que após a retificação das rolhas para 48 x 30,5 mm, são expostas novas superfícies e torna-se importante avaliar a eficácia do SR nos discos, verificando a quantidade de TCA presente nos mesmos. Para isso, cortaram-se as rolhas cerca de 2 mm abaixo do corpo aglomerado e procedeu-se à maceração individual dos discos em frascos de 60 mL com água e durante 24 h. Posteriormente, procedeu-se a uma nova análise de TCA pelo método de análise SPME-GC-ECD e repetiu-se este procedimento após um e dois meses.

Os resultados de TCA foram obtidos com o método de análise de cloroanisóis na gama de trabalho de 0,5 a 5,5 ng/L (Anexo 1). Apenas para ter uma ideia da ordem da grandeza, os resultados superiores a 5,5 ng/L foram obtidos por extrapolação e os valores inferiores a 0,5 ng/L são considerados ND. Na Tabela A.4.1 encontram-se apresentados os valores de concentração de TCA nos discos, em ng/L, no momento inicial, após passagem no SR, após retificação e após dois meses. Não foi possível obter os resultados das análises de TCA após um mês devido a uma falha no sistema de análise.

Na Figura A.4.1 encontram-se apresentadas as percentagens de discos por cada gama de concentração de TCA no momento inicial, após passagem no SR, após retificação e dois meses após esta.

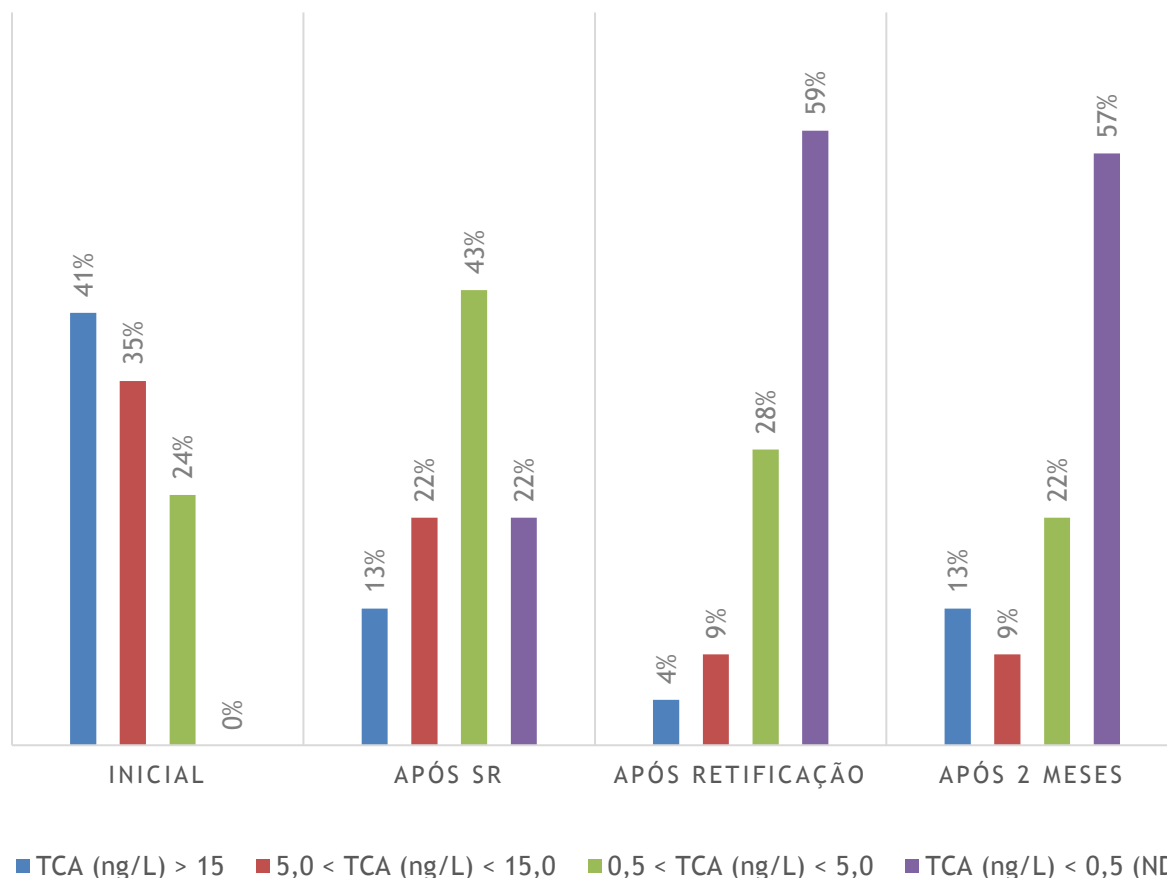


Figura A.4.1 - Percentagem de discos por cada gama de concentração de TCA, no momento inicial, após passagem no SR, após a retificação e após dois meses da retificação (n=46).

É de notar que, após passagem no SR, a quantidade de discos com TCA superior a 15 ng/L diminuiu de 41 % para 13 % e a quantidade de discos com TCA entre 5,0 ng/L e 15,0 ng/L diminuiu de 35 % para 22 %, o que levou a um aumento do número de discos com TCA inferior a 0,5 ng/L (ND) e de discos com TCA entre 0,5 ng/L e 5,0 ng/L (aumento de 0 % para 22 % e de 24 % para 43 %, respetivamente).

Com a diminuição do diâmetro dos discos (após retificação), a quantidade de discos com TCA inferior a 0,5 ng/L (ND) aumentou de 22 % para 59 %. Nestas situações, em que o valor de TCA diminui após retificação, é provável que o TCA se encontre localizado mais próximo à superfície dos discos, o que implica que após retificação (onde ocorreu redução de cerca de 3,5 mm do diâmetro) os valores de TCA sejam inferiores.

Relativamente aos resultados obtidos após dois meses da retificação, a quantidade de discos com TCA superior a 15 ng/L aumentou de 4 % para 13 % e houve uma ligeira diminuição do número de discos com TCA inferior a 0,5 ng/L (de 59 % para 57 %) e de discos com TCA entre 0,5 ng/L e 5,0 ng/L (de 28 % para 22 %). Isto deve-se ao facto de alguns discos apresentaram,

após dois meses, valores de TCA superiores aos valores de TCA obtidos após retificação, o que indica uma evolução do TCA com o tempo.

No entanto, estes resultados foram obtidos a partir de discos de lotes rejeitados por TCA, o que pode potenciar o reaparecimento do mesmo ao longo do tempo. Por esse motivo, no futuro serão realizados novos testes com discos provenientes de lotes aprovados.

Tabela A.4.1 - Valores de TCA dos discos no momento inicial, após o SR, após retificação e após 2 meses.

Nº sequencial	TCA inicial (ng/L)	TCA após SR (ng/L)	TCA após retificação (ng/L)	TCA após 2 meses (ng/L)	Nº sequencial	TCA inicial (ng/L)	TCA após SR (ng/L)	TCA após retificação (ng/L)	TCA após 2 meses (ng/L)
1	>5,5 (259,9)†	>5,5 (32,0)†	>5,5 (8,1)†	>5,5 (12,0)†	24	>5,5 (9,7)†	ND	ND	ND
2	>5,5 (217,8)†	>5,5 (144,4)†	ND	5,2	25	>5,5 (9,7)†	5,1	4,6	2,7
3	>5,5 (194,3)†	>5,5 (12,4)†	ND	ND	26	>5,5 (6,6)†	0,6	ND	0,9
4	>5,5 (166,1)†	>5,5 (9,5)†	>5,5 (94,1)†	>5,5 (19,0)†	27	>5,5 (6,4)†	0,8	ND	3,8
5	>5,5 (103,7)†	>5,5 (11,1)†	>5,5 (16,4)†	>5,5 (20,3)†	28	>5,5 (6,2)†	0,6	ND	ND
6	>5,5 (61,2)†	5,1	>5,5 (9,4)†	3,4	29	>5,5 (6,1)†	1,1	1,8	1,6
7	>5,5 (47,3)†	>5,5 (26,7)†	ND	ND	30	>5,5 (5,7)†	ND	ND	ND
8	>5,5 (29,6)†	>5,5 (6,9)†	ND	>5,5 (8,4)†	31	5,2	ND	ND	ND
9	>5,5 (27,5)†	>5,5 (15,9)†	ND	ND	32	5,1	0,8	>5,5 (14,8)†	>5,5 (91,9)†
10	>5,5 (24,3)†	1,8	ND	ND	33	5,1	1,9	ND	ND
11	>5,5 (22,5)†	>5,5 (15,3)†	ND	>5,5 (6,5)†	34	5,1	3,7	0,6	3,3
12	>5,5 (21,0)†	>5,5 (16,3)†	0,6	ND	35	5,1	5,2	0,7	0,8
13	>5,5 (19,7)†	ND	ND	ND	36	4,9	ND	1,5	ND
14	>5,5 (19,5)†	>5,5 (6,3)†	4,8	ND	37	4,8	ND	ND	ND
15	>5,5 (18,62)†	>5,5 (14,3)†	ND	>5,5 (27,2)†	38	3,9	0,6	ND	ND
16	>5,5 (17,7)†	>5,5 (6,0)†	0,9	4,8	39	3,6	0,5	ND	ND
17	>5,5 (17,4)†	1,5	ND	ND	40	194,3	12,4	ND	86,2
18	>5,5 (17,1)†	2,9	1,0	ND	41	21,0	16,3	0,6	0,5
19	>5,5 (17,0)†	3,0	2,8	ND	42	22,5	15,3	ND	74,5
20	>5,5 (13,1)†	1,6	ND	ND	43	27,5	15,9	ND	ND
21	>5,5 (12,6)†	4,7	0,9	>5,5 (18,7)†	44	47,3	26,7	ND	1,8
22	>5,5 (12,1)†	0,6	>5,5 (11,3)†	1,5	45	217,8	144,4	ND	55,7
23	>5,5 (11,0)†	0,6	ND	1,7	46	259,9	32,0	8,1	57,7

† >5,5 - valor superior da gama de concentração usada na reta de calibração (...) resultado obtido por extrapolação relativamente à gama de concentração.

Anexo 5 Tecnologias/processos alternativos para a redução do teor de pó da rolha de champanhe

O pó de cortiça é o resíduo produzido em maior quantidade na indústria corticeira, proveniente essencialmente das operações de granulação, trituração, retificação e acabamentos. Tendo em vista o aproveitamento máximo da matéria-prima, este resíduo é aproveitado como combustível em caldeiras na própria indústria, graças ao seu poder calorífico [35]. Para além disso, uma pequena percentagem deste pó é utilizada na colmatagem de rolhas de cortiça natural, através do preenchimento das lenticelas [8].

A existência de partículas em suspensão nos vinhos provenientes das rolhas de champanhe é uma problemática com maior importância em mercados como o asiático que, por utilizar garrafas transparentes, a mínima partícula em suspensão é facilmente detetada. As normas internas da CHK definem que o valor máximo admissível para a libertação de pó é de 2 mg/rolha. O levantamento dos resultados dos ensaios de quantificação de pó realizados no laboratório da CHK entre 2012 e 2018, apresentados na Figura A.5.1, mostram que são libertados em média, entre 0,3 a 0,6 mg/rolha, sendo o valor médio atual de cerca de 0,5 mg/rolha. Na sequência desta problemática, a A&I pretende encontrar, no decorrer de 2018, uma tecnologia que seja capaz de reduzir a quantidade de pó das rolhas de champanhe com uma eficácia de 50 % face ao conseguido atualmente na CHK, mantendo as características físico-mecânicas das rolhas.

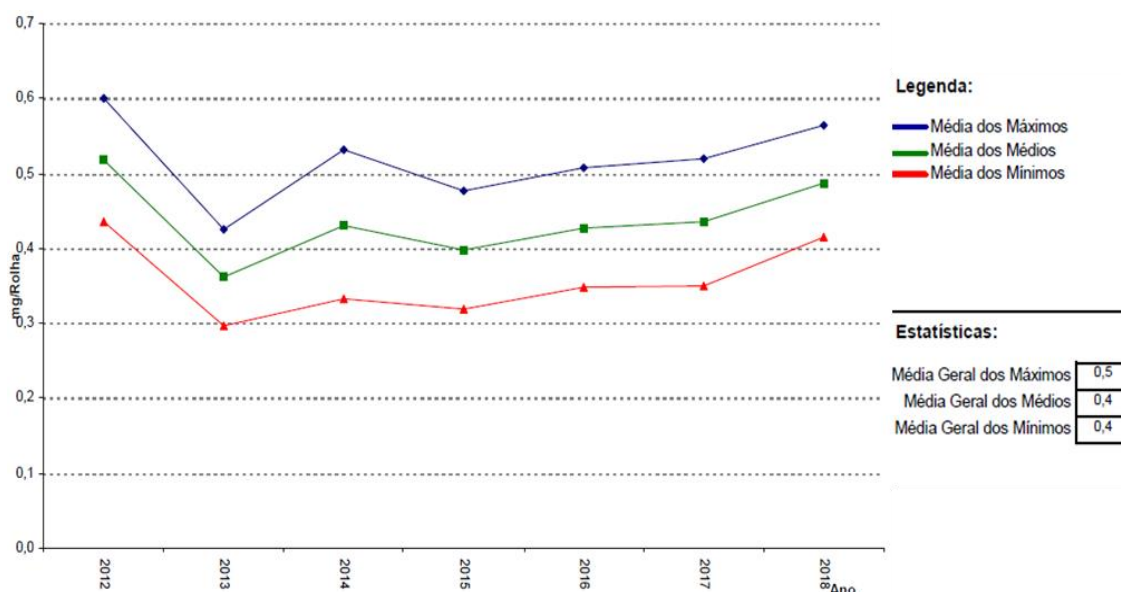


Figura A.5.1 - Média dos valores mínimos, médios e máximos dos ensaios de quantificação do teor de pó, registados entre os anos 2012 e 2018.

No processo de produção da CHK estão implementadas algumas medidas que permitem a redução do teor de pó nas rolhas. Após a colagem dos discos ao corpo aglomerado, a rolha passa pelo processo de retificação, onde se alisa a sua superfície e é ajustado o calibre. De seguida, a rolha é topejada, por forma a alisar os topos, e chanfrada no topo oposto aos discos. Durante este processo, a rolha é exposta a uma elevada ação mecânica que favorece a libertação de partículas. Por esse motivo, após a retificação da rolha, esta passa por uma escova rotativa acoplada a um sistema de aspiração com o objetivo de remover o pó do produto e aproveitá-lo para produção de biomassa. Na Figura A.5.2 estão apresentadas duas situações ocorrentes no processo de produção da CHK, sendo que à esquerda está presente uma escova que roda sobre si própria enquanto as rolhas descem, pela ação da gravidade, e rodam devido ao cilindro rotativo. Na imagem da direita, também pela ação da gravidade, as rolhas descem por um tubo semiaberto que se encontra entre duas escovas rotativas. É de notar a sujidade presente nas escovas, apesar de estar acoplado um sistema de aspiração e ser feita uma manutenção de limpeza às mesmas. A eficácia desta escovagem na redução da quantidade de pó libertado pela rolha é de 25 %.



Figura A.5.2 - Escovas no processo de retificação das rolhas.

Em seguida o processo de produção continua com a marcação das rolhas e termina com o tratamento de superfície e embalagem do produto. No tratamento de superfície são aplicados cerca de 40 mg/rolha de um produto CAF, à base de silicone, por forma a garantir a boa vedação da garrafa e uma fácil extração da rolha. Também esta fase promove uma grande libertação de partículas, uma vez que cerca de 18 000 rolhas são inseridas num tambor rotativo e estão em constante fricção umas com as outras durante 26 min. Por forma a reduzir a quantidade de pó nesta fase do processo, é feito um despoeiramento por aspiração e rotação nos 5 min iniciais bem como no último minuto. Na Figura A.5.3 é notória a acumulação de pó no tambor após o tratamento de superfície, pelo que é de grande importância a existência de uma manutenção e limpeza regulares. Sabe-se que a eficácia do despoeiramento e tratamento de superfície na redução do teor de pó libertado pela rolha é de 63 %.



Figura A.5.3 - Tambor (esquerda) para aplicação do tratamento de superfície (direita).

Das tecnologias testadas no decorrer de 2018, aquela que parece ser mais promissora na redução de pó é a que se baseia na descarga da energia electrostática seguida de aspiração fina do pó. O princípio assenta na remoção de cargas electrostáticas das rolhas (que se verificou existirem) em linha, acoplado com sistemas de aspiração com uma distância de cerca de 3 mm das rolhas. A eletricidade estática num ambiente de trabalho pode ser gerada, por exemplo, por granulados de cortiça que deslizam sobre superfícies isoladas, originando fricção. Esta pode provocar a atração e a acumulação de partículas indesejadas no substrato, dificultando a sua remoção e afetando negativamente o processo de produção. Para remover essas partículas da superfície do substrato, as cargas eletrostáticas devem ser neutralizadas antes do processo de limpeza, de modo a garantir uma superfície de substrato neutralizada e uma remoção eficiente de todas as partículas [36]. Tendo em consideração que a fase de retificação e topejagem é uma etapa crítica no que diz respeito à produção de pó, e havendo elevadas cargas eletrostáticas devido ao atrito a que as rolhas são sujeitas, a implementação de uma tecnologia de remoção eletrostática associada a um forte sistema de aspiração nesta fase do processo poderá ser uma solução para a diminuição do teor de pó do produto acabado. Com o intuito de implementar e testar a eficácia desta tecnologia na redução do teor de pó, foram realizadas reuniões com empresas da área da eletroestática. No entanto, durante o período de estágio não foi implementado nenhum equipamento para a realização de ensaios.

Tratamento de superfície PWS

A última etapa no processo de produção de rolhas de champanhe tem de ser o tratamento de superfície, uma vez que este facilita a entrada da rolha na garrafa e garante uma boa vedação da mesma.

Realizaram-se ensaios em rolhas com um tratamento de superfície PWS, utilizado na unidade de rolhas ATS, para verificar a eficiência da redução do teor de pó comparativamente ao tratamento de superfície CAF, que é utilizado atualmente na CHK.

Foi feita uma amostragem de 100 rolhas de champanhe 2D de calibre 48 x 30,5 mm com disco de espelho classe 0 e disco de interior classe 22, antes do tratamento de superfície. Aplicou-se o tratamento de superfície CAF em 50 rolhas, que servirão como rolhas testemunha e, na unidade industrial ATS, fez-se a aplicação do PWS nas restantes rolhas.

Realizou-se o ensaio de quantificação de pó das rolhas submetidas aos dois tratamentos, segundo a norma interna ME.GR.DCQ.02 / 4. Este ensaio consiste em colocar 3 rolhas num matraz de 500 mL, mergulhadas em 100 mL de solução hidroalcoólica a 10 % (v/v), que é depois colocado num agitador automático durante 15 min. Previamente, os filtros são colocados na estufa a 105 °C durante 1 h e depois são colocados no exsiccador durante 20 min. Após esse período, os filtros são numerados e pesados. Após a agitação dos matrizes, as soluções são filtradas a vácuo e os filtros são colocados novamente na estufa durante 1 h e no exsiccador durante 20 min para depois serem novamente pesados. Foram feitas 16 repetições, tanto para o CAF como para o PWS.

Verificou-se uma redução de 82 % da quantidade de pó libertado pelas rolhas nos ensaios com PWS (0,1 mg/rolha) face ao CAF (0,6 mg/rolha). A Figura A.5.4 apresenta os resultados de quantificação de pó com CAF e PWS, onde se pode comprovar a redução existente. O valor do ensaio 14, referente ao PWS, não foi considerado na média uma vez que se trata de um *outlier*.

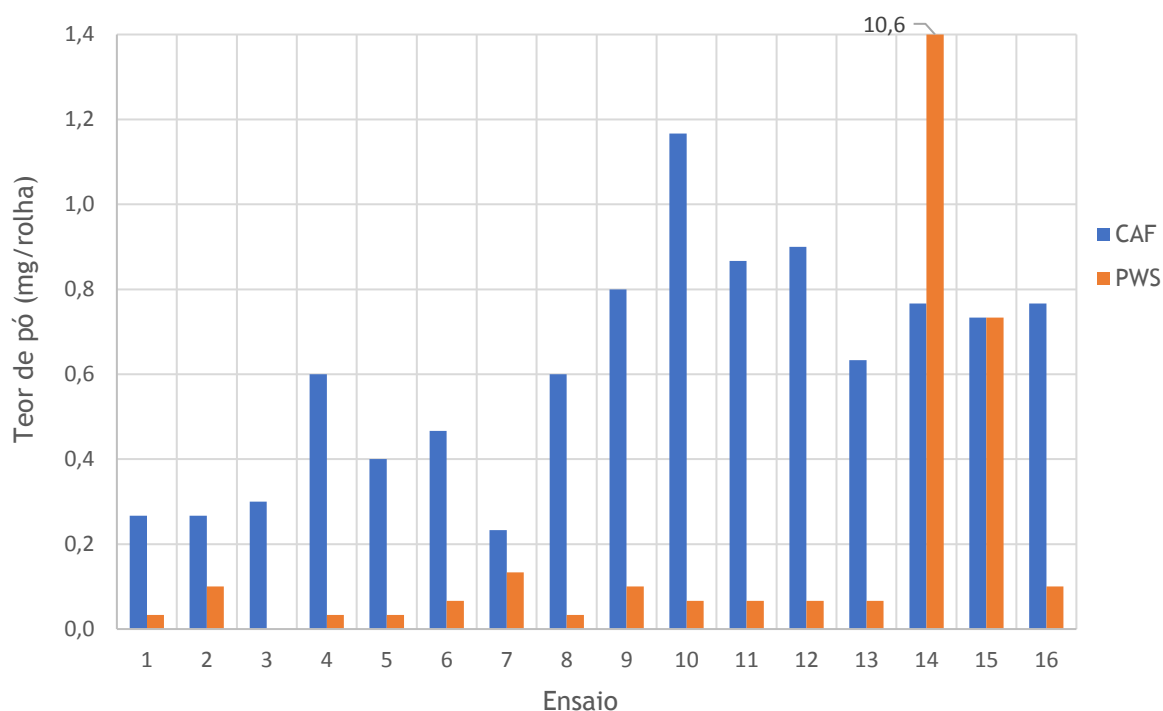


Figura A.5.4 - Teor de pó dos ensaios com rolhas tratadas com CAF e PWS.

A Figura A.5.5 apresenta exemplos comparativos de filtros após ensaio da quantificação de pó de rolhas com tratamento CAF e PWS. Observa-se que, de facto, a quantidade de pó libertado é muito superior nas rolhas com CAF.

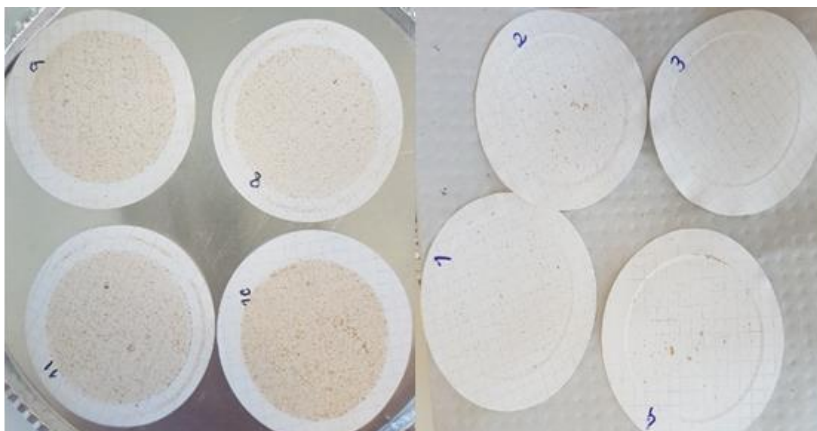


Figura A.5.5 - Exemplos de filtros de ensaios de quantificação de pó em rolhas com CAF (à esquerda) e em rolhas com PWS (à direita).

Apesar do tratamento com PWS resultar numa menor libertação de partículas, este provoca um ligeiro escurecimento das rolhas ao nível visual e não permite a correta inserção e extração em garrafa. A Figura A.5.6 pretende demonstrar a alteração de cor.



Figura A.5.6 - Comparação visual de rolhas com PWS (em cima) e CAF (em baixo).

Fizeram-se ensaios de migração em solução alcoólica a 12 % na estufa a 60 °C durante 10 dias. Após esse período, mediram-se as absorvâncias a 280 e 420 nm e fez-se um ensaio sensorial. Relativamente ao ensaio sensorial, não foram detetadas diferenças entre as rolhas tratadas com PWS e as rolhas tratadas com CAF. No entanto, é notória a diferença de cor entre as soluções referentes aos ensaios das rolhas tratadas com CAF e das rolhas tratadas com PWS, como se pode ver na Figura A.5.7.



Figura A.5.7 - Frascos após ensaios de migração de rolhas tratadas com PWS (em cima) e rolhas tratadas com CAF (em baixo).

Os valores de absorvâncias a 280 e 420 nm encontram-se na Tabela A.5.1. A intensidade da cor amarela, medida pelos valores de absorvância a 420 nm, dos ensaios com CAF foi o triplo dos ensaios com PWS. Para além disso, a composição fenólica, medida através da absorvância a 280 nm, foi bastante superior nas rolhas com CAF, em que as leituras atingiram o valor máximo de quantificação (10), enquanto que para os ensaios com PWS o valor médio foi de 2,338.

Tabela A.5.1 - Valores de absorvância a 280 e 420 nm após ensaios de migração com CAF e PWS.

CAF			PWS		
Ensaio	Abs (280nm)	Abs (420nm)	Ensaio	Abs (280nm)	Abs (420nm)
1	10,000	0,338	1	1,630	0,148
2	10,000	0,512	2	3,642	0,189
3	10,000	0,549	3	2,460	0,150
4	10,000	0,328	4	2,050	0,114
5	10,000	0,540	5	1,907	0,142
Média	10,000	0,453	Média	2,338	0,149